Wirkungsweise des Kernholztoxins Pinosylvinmonomethyläther auf Hydrogenomonas H16 und andere Mikroorganismen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Mansour Aggag

aus Biala/Ägypten

Göttingen 1966

Meinem Bruder gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544311_0016

Wirkungsweise des Kernholztoxins Pinosylvinmonomethyläther auf Hydrogenomonas H16 und andere Mikroorganismen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Mansour Aggag

aus Biala/Ägypten

Göttingen 1966

Diese Arbeit wurde im
Institut für Mikrobiologie
der Universität Göttingen
durchgeführt.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

D 7

Referent: Prof. Dr. H.G. Schlegel
Korreferent: Prof. Ruckmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.66.

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Methoden	4
1.	Bakterienstämme	4
2.	Nährlösung und Kultivierung der Zellen	4
3.	Messung des Bakterienwachstums:	6
	Trübungsbestimmung	6
	Proteinbestimmung	6
	Lebendzellzahlbestimmung	7
	Trockengewichtsbestimmung	7
4.	Bereitung zellfreier Extrakte	7
5.	Manometrische Messungen	9
6.	Bestimmung der oxydativen Phosphorylierung	10
7.	Bestimmung von Enzymaktivitäten	11
8.	Bestimmung der Ausscheidungsprodukte	14
9.	Bestimmung der freien Nucleotide und von Nucleinsäuren	17
10.	Bestimmung des Pinosylvinmonomethyläthers	17
11.	Bestimmung der bakteriziden Wirkung von Pinosylvinmonomethyläther	18
12.	Abkürzungen	20
13.	Herkunft der Biochemikalien und antimikrobiellen Substanzen	21
III.	Experimente und Ergebnisse	22
A: 1)	Bakterizide Wirkung von Pinosylvinmonomethyläther	22
2)	Anreicherung und Isolierung von PSM-resistenten Zellen	26
B:	Einfluss von Pinosylvinmonomethyläther auf einzelne Stoffwechselleistungen:	29
1)	Substratoxydation durch PSM-empfindliche und -resistente Zellen von Hydrogenomonas H 16	32

Seite

2) Wasserstoffoxydation durch intakte Zellen 38

3) Wasserstoffoxydation und Glucose-vergärung durch zellfreie Extrakte 40

4) Aktivität einzelner reiner Enzyme 43

5) Antagonistische Wirkung von Phospholipiden gegenüber Pinosylvinmonomethyläther 44

6) Oxydative Phosphorylierung durch zellfreie Extrakte aus Bäckerhefe 46

C: Einfluss von Pinosylvinmonomethyläther auf die Zellpermeabilität 49

1) Verlust der Kryptizität bei Hydrogenomonas H 16 und Escherichia coli ML-35 51

2) Ausscheidung von Zellbestandteilen 57

IV. Elektronenmikroskopische Untersuchung PSM-behandelter Zellen 67

V. Diskussion 70

VI. Zusammenfassung 80

VII. Literaturverzeichnis 82

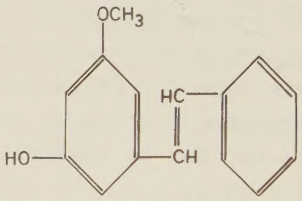
I. EINLEITUNG

Knallgasbakterien vermögen sowohl autotroph (chemolithotroph) mit molekularem Wasserstoff als H-Donator, Sauerstoff als H-Acceptor und CO_2 als C-Quelle zu wachsen als auch organotroph mit einer Reihe von organischen Substraten unter aeroben Bedingungen. Bei einigen Stämmen wird die Geschwindigkeit der Wasserstoffoxydation durch die Ab- oder Anwesenheit von Kohlendioxyd reguliert. Bei Hydrogenomonas Stamm H 16 ist diese durch CO_2 bewirkte Erhöhung der H_2-Oxydationsrate intensiv untersucht worden (BARTHA 1962). Nach EBERHARDT (1965) wird die Rate der Gasaufnahme durch Kohlendioxyd auf das 4,8-fache beschleunigt. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die H_2-Oxydation mit der CO_2-Fixierung eng gekoppelt ist. Außer durch Kohlendioxyd wird die Rate der Gasaufnahme lediglich durch Methylenblau oder Thionin, nicht aber durch andere geprüfte Entkopplungsgifte auf den in Gegenwart von CO_2 gemessenen Wert erhöht. Lediglich m-Cl-CCP steigerte die Rate der Leerlaufoxydation auf das 2,5-fache (HIPPE 1966; SCHLEGEL 1966). Da der bekannte Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung 2,4-DNP zu einer nur sehr geringen Erhöhung der Oxydationsrate in Abwesenheit von CO_2 führte (20 bis 30%; BARTHA 1962), wurde nach anderen möglicherweise entkoppelnden Agenzien gesucht.

Bei der Untersuchung der Wirkungsweise von Pinosylvinmonomethyläther und von anderen Kernholztoxinen (ß- und ɣ-Thujaplicin und 7-Hydroxyisopropyltropolon) stellte LYR (1961) eine Förderung der endogenen Atmung isolierter Mitochondrien von holzzerstörenden Pilzen durch 10^{-6}M Pinosylvinmonomethyläther fest. Die Befunde führten zu der Schlußfolgerung, daß die untersuchten Kernholztoxine als typische Entkopplungsgifte wirken und die natürliche Resistenz des Holzes gegen Mikroorganismen und Insekten

somit auf ein die oxydative Phosphorylierung entkoppelndes Agenz zurückgeführt werden kann.

Pinosylvin (PS) und dessen Monomethyläther (PSM) ließen sich im Kernholz von Pinus-Arten nachweisen; beide Verbindungen sind von starker fungizider Wirkung (RENNERFELT 1943, 1945; RENNERFELT und NACHT 1955). Im Kernholz von Pinus silvestris liegen sie bis zu einem Gehalt von 3% vom Trockengewicht vor und sind im Kernholz der meisten Kiefernarten nachweisbar (ERDTMAN 1953). PS und PSM wurden 1939 von ERDTMAN isoliert; er klärte auch ihre chemische Struktur auf.



Pinosylvinmonomethyläther

Die vorliegende Arbeit hatte die Klärung der Frage zum Ziel, ob PSM auch bei Knallgasbakterien zur einer Entkopplung des Elektronentransports von der Phosphorylierung führt und die Leerlaufoxydation erhöht. Es ließ sich jedoch keine ausgesprochen entkoppelnde Wirkung nachweisen, stattdessen waren bei Anwendung verschiedener PSM-Konzentrationen Veränderungen der Zellpermeabilität festzustellen, die den von oberflächenaktiven Agenzien ausgehenden Wirkungen ähnlich waren. Im übrigen wirkte PSM stark mikrobizid. Die Arbeit behandelt daher insbesondere die Wirkung von PSM auf Hydrogenomonas Stamm H 16 und andere

Mikroorganismen und den Vergleich dieser Wirkung mit verschiedenen Entkopplern und oberflächenaktiven antimikrobiellen Substanzen.

II. METHODEN

1. Bakterienstämme

Hydrogenomonas Stamm H 16 (WILDE 1961), Leuconostoc mesenteroides und Escherichia coli-B wurden der Institutssammlung entnommen; Escherichia coli-ML 35 wurde freundlicherweise vom Institut Pasteur (Dr. J. MONOD) zur Verfügung gestellt. Die Backhefe stammte von der Firma Germania.

2. Nährlösung und Kultivierung der Zellen

Nährböden für Hydrogenomonas H 16:

Zur Kultur von Hydrogenomonas H 16 unter chemolithotrophen Bedingungen wurde folgendes Mineralmedium verwendet (SCHLEGEL, KALTWASSER und GOTTSCHALK 1961):

Grundlösung: $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ 0,9%; KH_2PO_4 0,15% und $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,02%

Der Grundlösung wurden je ein Volumenprozent der Lösungen A($FeNH_4$-citrat 0,05%; $CaCl_2$ 0,1%), B($NaHCO_3$ 5%) und 0,15 Vol% Hoaglandsche Spurenelementlösung C zugesetzt. A, B und C wurden getrennt sterilisiert; End-pH 7,0.

Zum chemoorganotrophen Wachstum wurde die Mineralnährlösung durch organische Substrate (jeweils 0,5%) ergänzt. Zur Verfestigung wurde diese Nährlösung mit 2% Agar versetzt.

Nährlösung für Escherichia coli-ML 35: (BROCK u. BROCK 1959)

Lösungen A (Na_2HPO_4 0,6%; KH_2PO_4 0,3%; NH_4Cl 0,1%; NaCl 0,05%; $MgSO_4$ 0,02%) und B (Glucose 0,4%) werden getrennt sterilisiert und kalt vereinigt.

Kultur des zu physiologischen Versuchen verwendeten H 16-Zellmaterial.

Chemolithotrophe Kultur:

Das zu den Versuchen benötigte Zellmaterial wurde C-autotroph in Mineralösung unter Knallgas-CO_2-Atmosphäre nach dem von SCHLEGEL, KALTWASSER u. GOTTSCHALK (1961) beschriebenen Rührverfahren herangezogen.
Als Kulturgefäße wurden 500 ml-Saugflaschen aus Jenaer Glas benutzt. Der Hals der Saugflaschen war mit Gummistopfen verschlossen. An den Saugstutzen wurde ein mit einem Glashahn verschließbares Wattefilter angebracht. Zum Rühren diente ein teflonbezogenes Magnetstäbchen. Die so ausgerüstete und mit 100 bis 200 ml Mineralösung beschickte Saugflasche konnte autoklaviert, beimpft, dann evakuiert und mit dem gewünschten Gasgemisch gefüllt werden.

Das verwendete Gasgemisch enthielt 10% CO_2 und je nach Dichte der Zellsuspension 10 - 30% O_2 und 80 - 60% H_2. Nach Füllen der Saugflasche wurde die Verbindung zur Gasometerflasche (mit Ausgleichgefäß) über das Wattefilter offen gelassen, sodaß laufend neues Gasgemisch nachgesogen werden konnte. Zur Anzucht kleinerer Zellmengen, die z.B. für einen Warburgversuch benötigt wurden, eignete sich dieses Verfahren, das sich durch Zuverlässigkeit und minimalen Arbeitsaufwand auszeichnete, vorzüglich.
Für die Anzucht von größeren Zellmengen oder für Versuche von längerer Dauer wurden die von SCHLEGEL, KALTWASSER und GOTTSCHALK (1961) beschriebenen Zweihalskolben benutzt.
Die Rührgeschwindigkeit betrug in beiden Fällen 650 U/Min., die Temperatur 28°C.

b) Chemoorganotrophe Kultur:

Zur Heranzucht kleiner Zellmengen (100 ml) dienten I l - Erlenmeyerkolben als Kulturgefäße. Der Erlenmeyerkolben wurde bei 28°C auf der Schüttelmaschine unter Luft geschüttelt. Zur Anzucht größerer Zellmengen wurden 3 l - oder 6 l - Zweihalskolben benutzt, die unter Luft gerührt wurden.

c) Escherichia coli ML 35 -Kultur:

100 ml Nährlösung (in I l-Erlenmeyerkolben) wurden von einer Schrägagarkultur beimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde erneut auf 100 ml Nährlösung überimpft und ebenfalls bei 37°C geschüttelt. Das Wachstum wurde durch photometrische Messung der Trübung verfolgt bis die gewünschte Wachstumsphase erreicht war ($E_{436\ m\mu} = 0{,}25$). Diese Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden zur Bestimmung der ß-Galactosidase-Aktivität verwendet.

3. Messung des Bakterienwachstums

A. Trübungsmessung: Die Trübung der Zellsuspensionen wurde mit Hilfe eines Eppendorf-Photometers bei $\lambda = 436\ m\mu$ (Photozelle 90 S) bestimmt. Alle Bestimmungen erfolgten in Spiegelglas-Küvetten (d = 1 cm) gegen Wasser als Kontrolle und im Extinktionsbereich 0-0,4.

B. Proteinbestimmung an intakten Zellen: Es kam die von SCHMIDT u.a. (1963) modifizierte Biuret-Methode nach LA RIVIÈRE (1958) zur Anwendung. Die gebrauchten Reagenzien waren:

a:(16%ige Natronlauge); b: (6g KNa-Tartarat; 5g NaOH; 1,25g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ und 3,125g KJ) in 500 ml Wasser.

Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und dann auf 4 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 0,4 ml der Lösung a kochte man 5 min im Wasserbad, kühlte auf Zimmertemperatur ab und ließ nach Zusatz von 1,6 ml der Lösung b 20 min bei 37°C stehen. Die Ansätze wurden dann 20 min bei 400 U/min abzentrifugiert. Die Extinktion des klaren Überstehenden wurde im Eppendorf-Photometer bei λ = 546 mμ (d = 2 cm, Spiegelglas-Küvette, Photozelle 90 S) bestimmt. Unter diesen Bedingungen entsprechen einer Extinktion von 0,1 = 1,18 mg Rinderserumalbumin im Ansatz.

C. Lebendzellzahl: Die Lebendzellzahl, also Zellen/ml einer Suspension, die zur Koloniebildung befähigt sind, wurde nach stufenweiser Verdünnung durch Ausstreichen auf Mineral-Fructose-Platten ermittelt. Die Zellsuspension wurde mit sterilem Wasser soweit verdünnt, daß auf jeder Platte etwa 50 bis 100 Kolonien wuchsen. Die Kolonien wurden nach 48stündiger Bebrütung bei 28°C ausgezählt.

D. Trockengewichtsbestimmung: Die Trockengewichtsbestimmungen erfolgten an gewaschenen Bakteriensuspensionen in kleinen aus Aluminiumfolie hergestellten Bechern. Die Proben wurden bei 105°C 12-25 Stunden getrocknet und vor dem Wiegen im Exikator über Silicagel abgekühlt.

4. Bereitung zellfreier Extrakte:

a. Aus Hydrogenomonas H 16

Autotroph gewachsene Zellen von Hydrogenomonas Stamm H 16 wurden abzentrifugiert, mit Aqua dest. gewaschen und mit möglichst wenig 5%iger Glycerin-Lösung aufgenommen. Nach Zusatz von neutralisierter Cystein-Hydrochloridlösung (M/500), $MgCl_2$ (M/500) und Titriplex III (M/1000) wurde diese eingefroren und bei -15°C aufbewahrt.

Zum Aufschließen der Zellen mit Hilfe von Ultraschall wurde die Suspension aufgetaut und so viel davon abzentrifugiert, daß das Volumen der gepackten Zellen etwa 1 ml betrug. Die Zellen wurden in 0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,0, mit den oben genannten Zusätzen aufgenommen und der Ultraschall-Behandlung unterworfen. Die Behandlung wurde jeweils nach 20 Sec unterbrochen, um die Temperatur, die auf 8-10°C gestiegen war, wieder auf 0°C sinken zu lassen. Zur Entfernung der intaktgebliebenen Zellen und größeren Bruchstücke zentrifugierte man den Extrakt zunächst 10 min mit 10.000 g. Das Überstehende wurde als Rohextrakt (SI) verwendet.

b. Aus Bäckerhefe

Saccharomyces cerevisiae wurde als Bäckerhefe (von der Firma Germania) gekauft und bis zur Verwendung bei +5°C aufbewahrt.
Etwa 100 g Hefe wurden in einem großen, vorgekühlten Mörser mit dem 2-3fachen Gewicht an gekühltem Seesand (mit Salzsäure gereinigt, Riedel-de Haen) bis zur Verflüssigung des Ansatzes gerieben. Nach Zugabe von Puffer (0,5 M Saccharose; 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,001 M Titriplex III) wurde der Sand durch 10 min Zentrifugation mit 3000 U/min (5°C) entfernt. Intakt gebliebene Hefezellen wurden durch zweimalige Zentrifugation bei 2500 g (jeweils 20 min; 0°C) abgeschieden. Der so gewonnene Rohextrakt wurde 60 min bei 25.000 g zentrifugiert. Das dabei erhaltene Sediment (Mitochondrien-Fraktion) wurde mit dem obengenannten Puffer aufgenommen (ca. 10 ml), homogenisiert und zur Bestimmung der oxydativen Phosphorylierung verwendet.

Für die Gärversuche wurden die Hefezellen wie oben aufgeschlossen. Die zerriebenen Zellen wurden aber in 0,067 M Phosphat-Puffer, pH 7,0, aufgenommen. Nachdem die intakten Zellen durch zweimaliges Zentrifugieren entfernt waren, wurde der Rohextrakt verwendet.

5. Manometrische Messungen

Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit 0,067 M Phosphat-Puffer nach SÖRENSEN pH 7,0 gewaschen und in diesem aufgeschwemmt. Die Suspensionsdichte wurde so bemessen, daß die Gasaufnahme im günstigen Meßbereich lag. Als Warburg-Apparatur wurde ein Rundwarburg der Firma Braun (Melsungen) benutzt: Schüttelfrequenz 120 Hin- und Hergänge in der Minute; Amplitude 4 cm; Temperatur 30°C. Die benutzten Gefäße waren meistens zweiarmige Standardgefäße mit Volumina zwischen 15 und 17 ml. Gefäße, in denen die Gasaufnahme in Abwesenheit von CO_2 gemessen werden sollte, enthielten 0,2 ml 20%ige KOH und einen Filterpapier-Fächer im Zentralzylinder. Den Gefäßen mit CO_2 im Gasgemisch wurden 0,2 ml $NaHCO_3$-Lösung (mit 2,16 mg $NaHCO_3$) zugesetzt, um eine rasche Gleichgewichtseinstellung zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase zu gewährleisten. Nach dem Einhängen in das Wasserbad (30°) wurden die Gefäße mit etwa 1,5 l des jeweiligen Gasgemisches pro Gefäß durchströmt. Nach 20 min Temperaturausgleich wurden die Hähne geschlossen und mit der Ablesung begonnen.

6. Bestimmung der oxydativen Phosphorylierung durch zellfreie Extrakte aus Bäckerhefe.

Sauerstoffaufnahme und Veresterung von anorganischem Phosphat wurden mit folgendem Ansatz bestimmt:

1,5	mmole	Saccharose
30	µmole	Phosphat pH 7,4
10	"	$MgSO_4$
60	"	NaF
100	"	Glucose
10	mg	Rinderserumalbumin (wo angegeben)
0,1	"	Hexokinase (8000 E. n. Bücher/mg)
0,5	ml	Extrakt
0,01	"	Äthylalkohol
		CTAB
		PSM (wo angegeben)
		2,4-DNP
30	µmole	Succinat
2	"	ADP

Gesamtvolumen 3,0 ml

Pinosylvinmonomethyläther wurde in alkoholischer Lösung zugesetzt. 2,4-DNP und CTAB waren in Wasser gelöst. Die Gifte hatten vor Versuchsbeginn etwa 10 min Kontakt mit dem Extrakt. Die Versuche wurden in einem Warburgapparat durchgeführt. Die Sauerstoffaufnahme wurde manometrisch bestimmt, die Veresterung von anorganischem Phosphat wurde nach Abstoppen mit 0,3 ml 3,3 M Perchlorsäure und Abzentrifugieren des ausgefällten Proteins nach der Vorschrift von PIRSON und KUHL (1958) bestimmt.

Glucose-6-phosphat wurde enzymatisch mit G-6-PDH als Hilfsenzym bestimmt:

2,82 ml TEA-Puffer (0,3 M, pH 7,5)
0,02 " $MgCl_2$ (0,1 M)
0,05 " NADP (10 mg/ml)
0,10 " Probelösung (unverdünnter, proteinfreier Testansatz)
0,01 " G-6-PDH

Messung der Extinktionszunahme bei 366 mμ

7. Bestimmung von Enzymaktivitäten: (nach Boehringer-Informationen)

Alkohol-Dehydrogenase: Optischer Test nach BÜCHER und REDTZKI (1951).
Messung: In 1 cm-Quarz-Küvette wurden folgende Reagenzien nacheinander pipettiert: 2,39 ml Puffer (Zusammensetzung: 10 g Na-Pyrophosphat·10 H_2O+2,5 g Semicarbazid·HCl + 0,5 g Glycin + 3,0 ml C_2H_5OH + 10 ml 2 N NaOH ad 300 ml, pH 8,7); 0,1 ml NAD (20 mg/ml); 0,01 ml Alkohol oder PSM. Mit einem unten abgeflachtem Kunststoff-Stab mischt man 0,1 ml verdünnte ADH-Lösung ein und die Zunahme der Extinktion bei 366 mμ wird verfolgt.

Enolase: Optischer Test durch Kopplung an Pyruvatkinase, Lactatdehydrogenase nach BEISENHERZ et al. (1953).
Messung: Nacheinander in die 1 cm-Küvette pipettieren: 2,43 ml TEA-Puffer (0,05 M; pH 7,6); 0,15 ml 0,5 M $MgSO_4$ + 2 M KCl (1:1); 0,2 ml ADP, (10 mg/ml); 0,05 ml NADH (10 mg/ml); 0,10 ml 2-PG (10 mg/ml); 0,02 ml PK (2 mg/ml); 0,02 ml LDH (2 mg/ml). 0,01 ml Alkohol oder PSM-Lösung. Mit unten abgeflachtem Kunststoff-Stab mischte man 0,02 ml verdünnte Enolase-Enzymlösung ein. Nachdem die Extinktion bei 366 mμ um 0,05 abgefallen war, wurde die Zeit gestoppt, die für eine weitere Extinktionsabnahme von genau 0,05

verstrich.

Fructose-1,6-diphosphat Aldolase: Optischer Test durch Kopplung an GDH und TIM nach RACKER (1947).

Messung: Nacheinander in 1 cm-Küvette pipettieren: 2,84 ml 0,05 M TEA-Puffer, pH 7,6; 0,05 ml NADH (10 mg/ml); 0,05 ml FDP (Natriumsalz; 30 mg/ml); 0,02 ml GDH-TIM-Mischung (2 mg/ml); 0,01 ml Alkohol oder PSM-Lösung. Mit einem unten abgeflachtem Kunststoff-Stab mischte man 0,01 ml verdünnte Aldolase-Lösung ein. Nachdem die Extinktion um 0,1 abgefallen war, wurde die Zeit gestoppt, die für eine weitere Extinktionsabnahme von genau 0,1 verstrich.

Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase: Optischer Test durch Kopplung an PGK nach BEISENHERZ et al. (1953).

Messung: Folgende Reagenzien wurde in 1 cm-Quarzküvette einpipettiert: 2,52 ml M/20 TEA-Puffer, pH 7,6; 0,10 ml 3- PG (50 mg/ml); 0,20 ml ATP (10 mg/ml); 0,05 ml Cystein neutralisiert (300 mg/10 ml); 0,04 ml 0,5 M $MgSO_4$; 0,05 ml $NADH_2$ (10 mg/ml); 0,01 ml PGK (2 mg/ml); 0,01 ml Alkohol oder PSM-Lösung und 0,02 ml verdünnte GAPDH-Lösung. Die Extinktionsabnahme wurde bei 366 mμ verfolgt.

Lactat-Dehydrogenase: Optischer Test nach KUBOWITZ und OTT (1943).

Messung: Nacheinander in die 1 cm-Küvette pipettiert: 2,72 ml 0,05 M TEA-Puffer (pH 7,6; 0,2 ml Natriumpyruvat (4 mg/ml); 0,05 ml $NADH_2$ (10 mg/ml); 0,01 ml Alkohol oder PSM-Lösung. Mit unten abgeflachtem Kunststoff-Stab 0,02 ml verdünnte Enzymlösung einmischen und die Extinktionsabnahme bei 366 mμ verfolgen.

Pyruvatkinase: Optischer Test durch Kopplung an Lactatdehydrogenase nach BEISENHERZ et al. (1953).

Messung: In 1 cm-Quarzküvette wurden nacheinander einpipettiert: 2,49 ml 1/20 M TEA-Puffer pH 7,6; 0,15 ml 0,5 M $MgSO_4$ + 2 M KCl (1:1); 0,06 ml 0,12 M PEP; 0,20 ml ADP (10 mg/ml); 0,05 ml $NaDH_2$ (10 mg/ml); 0,01 ml Alkohol oder PSM-Lösung. Mit unten abgeflachtem Kunststoff-Stab mischt man 0,02 ml LDH (5 mg/ml) ein und wartet ca. 3 min; evtl. im PEP-Präparat enthaltene BTS ist dann abreagiert. Nun mischt man weiter 0,02 ml der Pyruvat-Kinase (1:100 mit eiskaltem Wasser verdünnt) ein und verfolgt die $NaDH_2$-Extinktionsabnahme bei 366 mμ.

Bestimmung der ß-D-Galaktosidase-Aktivität:

Der Bestimmung der ß-D-Galaktosidase lag die Messung des bei der Spaltung von o-Nitro-Phenyl-ß-D-Galaktosid (ONPG) freigesetzten o-Nitrophenols zugrunde, das bei der Wellenlänge maximaler Absorption, bei = 420 mμ photometrisch erfaßt werden kann. (LEDERBERG 1950). Es wurde auf folgende Weise vorgegangen: 1 ml Zellsuspension oder 1 ml des Überstehenden wurden zu 4 ml M/600 ONPG (gelöst in 0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,0) pipettiert und gut geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde drei Minuten bei 28°C im Wasserbad inkubiert; dann wurde die Reaktion durch Zusatz von 5 ml kalter I M Natriumcarbonatlösung abgestoppt. Um eine weitere Hydrolyse des ONPG-Substrates zu vermeiden, wurden die Proben kühl aufbewahrt bis alle Proben abgestoppt waren (ROTMAN 1958), dann wurden die Proben bei 4°C 20 Minuten bei 4500 U/min abzentrifugiert. Die Extinktion des Überstehenden wurde bei 420 mμ in 1 cm Glas-Küvetten im Zeiss-Photometer gemessen. Die nach Alkalizusatz nicht enzymatisch ablaufende Hydrolyse wurde gemessen und bei der Auswertung rechnerisch berücksichtigt. Die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme ist ein Maß für die Hydrolyserate des ONPG. Die Aktivität der ß-Galaktosidase wurde in ΔE 420 pro Stunde pro mg Protein angegeben.

8. Bestimmung der Ausscheidungsprodukte

A. Bei 260 mμ absorbierende Substanzen:

Die Messungen wurden im Zeiss-Spektrophotometer PMQ II in Quarz-Küvetten (d = 1 cm) durchgeführt. Da PSM im UV stark absorbiert, mußte es zuerst extrahiert werden. Alle Proben (Kontrolle und die mit anderen Giften behandelten Proben) wurden ebenfalls extrahiert. Bei der Extraktion wurde in folgender Weise vorgegangen: 1 Volumen der Probelösung (3 ml) wurde mit 3 Volumina Peroxid-freiem Äther in einem langen 25 ml-Scheidetrichter für 3 bis 5 min geschüttelt; dann wurde die untere wäßrige Schicht abgetrennt, der Äther nochmals mit 2 ml bidest. Wasser geschüttelt und zu der wäßrigen Lösung gegeben. Die extrahierte Lösung wurde 10 min in kochendem Wasserbad gehalten bis der Äther verdunstet war. Die ätherfreie Lösung wurde abgekühlt und auf 6 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt und deren UV-Spektrum aufgenommen. Als Kontrolle dienten 3 ml Tris-Puffer, die genau wie oben behandelt worden waren. Durch dieses Extraktionsverfahren wurde PSM fast vollständig extrahiert.

B. Kalium-Ionen:

Der Gehalt an Kalium-Ionen wurde mit Hilfe eines Flammenphotometers mit Propangasbrenner bestimmt. Als Nullwert diente bidest. Wasser und als 100-Wert eine Eichlösung mit 50 μg K/ml in Form einer KCl-Lösung.

C. Anorganisches Phosphat:

Der Gehalt an anorganischem Phosphat in der überstehenden Lösung wurde nach PIRSON u. KUHL (1958) bestimmt.
Verwendete Reagenzlösungen:
0,5% Ammoniummolybdatreagenz in 1 N H_2SO_4
5,0% $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ in 0,5 N H_2SO_4

Die Ferrosulfatlösung liefert erfahrungsgemäß erst nach 24stündigem Stehen genaue Meßergebnisse; sie war bis zu zwei Tage verwendbar. Die phosphathaltige Lösung wurde mit bidest. Wasser so verdünnt, daß sie 1-20 µg anorg. Phosphat/ml enthielten. Zur Bestimmung des anorganischen Orthophosphates wurden in Reagenzgläser nacheinander einpipettiert:

Phosphathaltige Lösung	1 ml
Ammoniummolybdatreagenz	3 ml
Ferrosulfatreagenz	1 ml

Der Ansatz wurde gut gemischt; genau 20 min nach Zugabe des Reaktionsmittels wurde die Extinktion der Lösung bei 720 mµ im Zeiss-Spektrophotometer in einer Glasküvette (d = 1 cm) gegen eine gleichbehandelte Blindlösung gemessen, in der die phosphathaltige Lösung durch Tris-HCl Puffer ersetzt war.

D. Pentosen:

Der Gehalt an Pentosen wurde nach MEJBAUM (1939) bestimmt. D-Ribose wurde als Standard für die Eichkurve verwendet. Die pentosehaltigen Lösungen wurden mit bidest. Wasser so verdünnt, daß sie 1-20 µg Pentose/ml enthielten. Verwendete Reagenzien:

Bial'sches Reagenz	
Konz. HCl (1,19 sp. gr.)	100 ml
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	100 mg
Orzin	100 mg

$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ wurde in HCl aufgelöst und in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Orzin wurde der $FeCl_3$-HCl-Lösung direkt vor dem Gebrauch zugegeben. Zur Bestimmung der Pentosen wurden in Reagenzgläser nacheinander einpipettiert:

Pentosehaltige Lösung	2 ml
Bial'sche Reagenz	2 ml

Der Reaktionsansatz wurde geschüttelt und 35 min in kochendem Wasserbad gehalten; danach wurden die Reagenzgläser abgekühlt und auf 4 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt. Die Extinktion der entwickelten Farbe wurde bei 660 mμ in Glasküvetten (d = 1 cm) im Zeiss-Spektrophotometer gegen eine gleichbehandelte Blindlösung gemessen, in der die pentosehaltige Lösung durch das entsprechende Lösungsmittel ersetzt war.

E. Desoxypentosen:

Desoxypentosen wurden nach BURTON (1956) bestimmt. 2-Desoxyribose wurde als Standard für die Eichkurve verwendet.

Verwendete Reagenzien:

a. Diphenylamin 1,5 g
   Eisessig 100 ml
   Konz. HCl 1,5 ml
b. Wässrige Acetaldehydlösung (16 mg/ml bidest. Wasser)

1,5 g Diphenylamin wurden in 100 ml Eisessig aufgelöst, mit 1,5 ml H_2SO_4 versetzt und in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Direkt vor dem Gebrauch wurden 0,1 ml wässrige Acetaldehydlösung auf 20 ml des Reagenz a gegeben. Zur Bestimmung der Desoxypentose wurde in Reagenzgläser nacheinander einpipettiert:

Desoxypentoselösung 1 ml
Diphenylaminreagenz (a+b) 2 ml

Die Mischung wurde gut geschüttelt und 20 Std bei 28°C stehen gelassen. Die Extinktion der entwickelten Farbe wurde bei 600 mμ im Zeiss-Spektrophotometer gegen eine gleichbehandelte Blindlösung gemessen. in der die Desoxypentosehaltige Lösung durch das entsprechende Lösungsmittel ersetzt war.

9. Bestimmung der freien Nucleotide und von Nucleinsäuren

A. Bestimmung der freien Nucleotide:

5 ml Zellsuspension von Hydrogenomonas H 16 in 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,2 (5 mg Zell-TG/ml) wurden entnommen und sofort bei 3-5°C abzentrifugiert. Das Überstehende wurde bei 3-5°C für die Analyse der Ausscheidungsprodukte aufbewahrt. Das Sediment wurde mit Hilfe eines Vibrators gut suspendiert. Die freien Nucleotide wurden zweimal mit 5 ml 0,5 N $HClO_4$ für 20 min bei 3-5°C extrahiert. Der Extrakt wurde mit 0,5 N $HClO_4$ auf 10 ml aufgefüllt und bei 3-5°C für die Analyse aufbewahrt.
In dem Extrakt wurden Ribose- und Desoxyribose-haltige Nucleotide bestimmt.

B. Bestimmung der Nucleinsäuren:

Nach der Extraktion der freien Nucleotide wurden die Zellen homogenisiert und die Nucleinsäuren wurden durch zweimalige Extraktion mit 5 ml 0,5 N $HClO_4$ für 20 min bei 100°C extrahiert. Der Extrakt wurde auf 10 ml mit 0,5 N $HClO_4$ aufgefüllt. In dem Extrakt wurden RNS und DNS nach dem Gehalt an Ribose bzw. Desoxyribose bestimmt.

10. Bestimmung des Pinosylvinmonomethyläther

Wachsende Vorkulturen von resistenten und Wildtyp-Zellen von Stamm H 16 wurden in der logarithmischen Phase abzentrifugiert, zweimal mit 0,067 M Phosphat-Puffer, pH 7,0, gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in NH_4^+-freier Fructose-Nährlösung suspendiert (1,5 mg Zell TG/ml).
Beide Kulturen wurden mit derselben Giftkonzentration versetzt. Die Zellsuspension wurde in Reagenzgläser (je 3 ml) verteilt und bei 28°C geschüttelt. Die Probenahme erfolgte zu Beginn des Versuchs und nach 24stündiger Inkubation;

die Proben wurden bis zur Extraktion bei -15°C aufbewahrt.

Um den PSM von der Zellsuspension quantitativ zu extrahieren, wurde folgendes Verfahren angewandt:
Der Inhalt jedes Reagenzglases (3 ml Zellsuspension) wurde in 25 ml-Scheidetrichter transportiert, das leere Reagenzglas sorgfältig mit 10 ml Äther gespült, zu der Zellsuspension in den Scheidetrichter gegeben und mit der Zellsuspension gut geschüttelt. Diese Extraktion wurde dreimal wiederholt.
Die vereinigten Ätherfraktionen wurden dann mit Hilfe eines Büchi-Rotationsverdampfers bei 30°C eingeengt; der zurückgebliebene PSM wurde in 6 ml absolutem Alkohol quantitativ aufgenommen und nach entsprechender Verdünnung durch Messung der Extinktion bei 300 mμ in Quarz-Küvetten (d = 1 cm, Zeiss-Photometer) photometrisch bestimmt. Die Extinktion wurde gegen eine gleichbehandelte Blindlösung gemessen, in der die Giftlösung durch absoluten Alkohol ersetzt war. Die Eichkurve wurde im Bereich von 1 - 10 μg PSM/ml Alkohol ermittelt.
UV-Spektren wurden auch aufgenommen, um zu ermitteln, ob eine Änderung in der chemischen Struktur des Giftes eingetreten war.

11. Bestimmung der baktericiden Wirkung von PSM

A. auf wachsende Zellen:

Die Zellen wurden durchweg chemoorganotroph mit 0,5% Fructose und Ammoniumsalz in Schüttelkultur bei 28°C herangezogen. Aus einer 24 Std alten Vorkultur wurde eine Schüttelkultur beimpft. Die Zellen wurden bei 28°C bis zu einer Extinktion von $E_{436\ m\mu} = 0{,}5$ (logarithmische Phase) geschüttelt. Die Zellsuspension wurde dann in 100 ml-Erlenmeyerkolben verteilt (gesamte Volumina 10 ml) und mit dem Gift versetzt. Als Kontrolle diente die gleiche

Menge Zellsuspension mit dem entsprechenden Lösungsmittel. Die Proben (0,5 ml) wurden nach der angegebenen Zeit entnommen und mindestens $1:10^3$ mit sterilem Wasser verdünnt; es wurde die Zahl der überlebenden Zellen bestimmt.

B. Auf nichtwachsenden Zellen:

Eine H 16-Vorkultur wurde in Fructose-Ammoniumsalz-Nährlösung in Schüttelkultur bei 28°C bis zu $E_{436\ m\mu} = 0,5$ angezogen. Die Zellsuspension wurde dann in sterilen 100 ml-Plastikflaschen abzentrifugiert, mit steriler ammoniumfreier Nährlösung zweimal gewaschen und in resuspendiert. Die Zellsuspension wurde über Nacht (12-15 Std) bei 28°C geschüttelt. Sie wurde dann auf $E_{436\ m\mu} = 0,5$ mit steriler NH_4^+-freier Nährlösung eingestellt, in 100 ml-Kolben verteilt und mit der entsprechenden Giftkonzentration behandelt. Die Proben (0,5 ml) wurden nach der angegebenen Zeit entnommen und mindestens $1:10^3$ mit sterilem Wasser verdünnt; es wurde die Zahl der überlebenden Zellen bestimmt.

12. Abkürzungen

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BTS	Brenztraubensäure
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNP	Dinitrophenol
FDP	Fructosediphosphat
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GDH	Glycerophosphatdehydrogenase
G-6-PDH	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
m-Cl-CCP	Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon
$NADH_2$	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
PCP	Pentachlorphenol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PG	Phosphoglycerat
PGK	Phosphoglyceratkinase
PK	Pyruvat-Kinase
PS	Pinosylvin
PSM	Pinosylvinmonomethyläther
TEA	Triäthanolamin
TIM	Triosephosphatisomerase
TPP	Thiaminpyrophosphat

13. Herkunft der Biochemikalien und antimikrobiellen Substanzen:

ADH, ADP, ATP, FDP, GAPDH, GDH, LDH, $NaDH_2$, PEP, PG, PGK, PK und TIM von der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim; Rinderserumalbumin (Fraktion V), lyophilisiert, rein von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg; Lecithin und Sphengomyelin von Mann Laboratories USA; CTAB und 2,4-DNP von British Drug Houses-England; Chloramphenicol von Parke, Davis Co. USA; Novobiocin von Merck & Co.; Streptomycinsulfat von Hoechst; Polymyxin B von Pfizer & Co., inc. USA; Tetracyclin von Farbenfabriken Bayer AG, Werk Wuppertal-Elberfeld; m-Cl-CCP von Calbiochem USA; ß-Thujaplicin, Nootkatin und PSM von Herrn Prof. Dr. H. Erdtman, Institut für organische Chemie der TH Stockholm.

PSM, Nootkatin und m-Cl-CCP wurden in Form alkoholischer Lösung zu der Zellsuspension versetzt.

III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

A: 1) Bakterizide Wirkung von PSM auf:

a. wachsende Zellen von Hydrogenomonas H 16

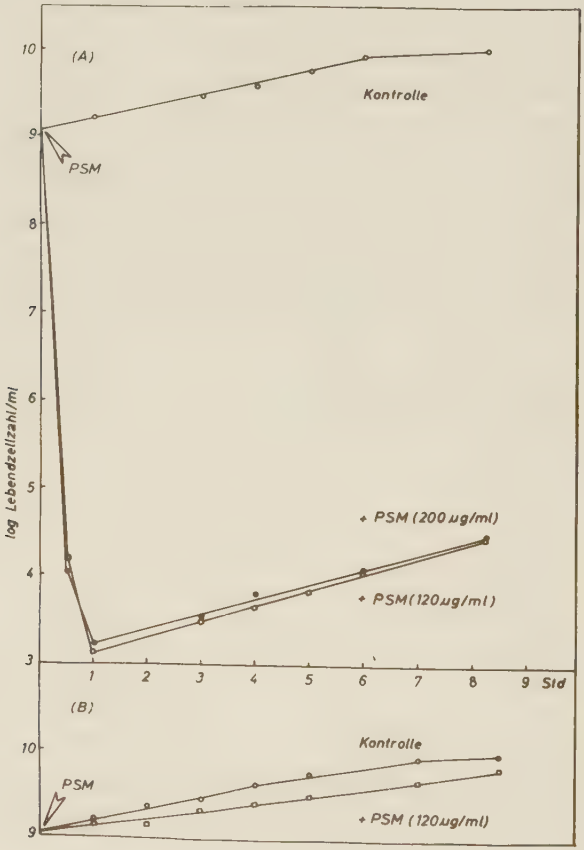


Abb.1 Zeitlicher Verlauf der Lebendzellzahl wachsender Suspensionen von Hydrogenomonas H 16 in Gegenwart von PSM.

A: Wildstamm-Zellen

B: PSM-resistente Zellen

Tab. 1: Herabsetzung des Koloniebildungsvermögens durch einstündige Inkubation einer Suspension von Hydrogenomonas H 16 unter Wachstumsbedingungen mit verschiedenen Konzentrationen von Pinosylvinmonomethyläther.

PSM-Konzentration µg/mg Zell-TG	Anfangs-Lebendzellzahl/ml	Lebendzellzahl/ml nach einstündiger Inkubation mit PSM	Zahl der überlebenden Zellen in Prozenten der PSM-freien Kontrolle
0	$1{,}15.10^9$	$1{,}66.10^9$	---
20	"	$1{,}77.10^9$	106
40	"	$1{,}63.10^9$	98,1
60	"	$0{,}99.10^9$	60
80	"	$0{,}6.10^9$	36
100	"	$3{,}58.10^7$	2,2
120	"	$6{,}9.10^4$	0,004
240	"	$1{,}31.10^3$	0,00007
400	"	$1{,}60.10^3$	0,00007

Die in Abb.1 und Tab.1 dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, daß PSM in höheren Konzentrationen (120 µg/ml) die Lebendzellzahl etwa auf 10^{-6} herabsetzt und die abtötende Wirkung bereits innerhalb einer Stunde ihr Maximum erreicht. Die Zahl der überlebenden Zellen geht mit zunehmender Gift-Konzentration rasch zurück. Wie Vorversuche ergeben haben, ist die Wirkungsgröße von PSM nicht von der Konzentration des Giftes (bezogen auf das Volumen des Suspensionsmediums), sondern in stärkerem Maße von der auf die Zellmenge bezogenen Konzentration abhängig.

Diese Relation deutet darauf hin, daß ein beträchtlicher Teil des Giftes von den Zellen absorbiert wird; es liegen ähnliche Verhältnisse vor, wie sie für oberflächenaktive Substanzen gefunden worden sind (BLISS et al. 1949; DE JONG 1949). Eine Abhängigkeit der Wirkungsgröße von der Populationsdichte ist auch für Antibiotika, insbesondere Polypeptid-Antibiotika, nachgewiesen worden und wird im Plattentest routinemäßig berücksichtigt.
Nach Abb.1 geht den Zellen die Fähigkeit, sich zu vermehren und Kolonien zu bilden, irreversibel verloren.

Unter den gegebenen Wachstumsbedingungen setzt jedoch sofort wieder Wachstum ein. Die gegenüber der Kontrolle erhöht erscheinende Wachstumsrate läßt sich auf die wachstumsfördernde Wirkung der aus den abgetöteten Zellen ausgetretenen Zellsubstanzen zurückführen.
Offenbar verhält sich ein gewisser Teil der Bakterienpopulation gegenüber PSM resistent. Diese Zellen, die als resistente Mutanten anzusprechen sind, sind in der Suspension etwa im Verhältnis von 10^{-6} enthalten.

b. nicht wachsende Zellen

Manche Antibiotika und Gifte entfalten ihre mikrobizide Wirkung nur auf wachsende Zellen. Die Wirkung dieser Verbindungen beruht im allgemeinen auf der Hemmung eines Biosyntheseprozesses; so wirkt Penicillin beispielsweise lediglich auf wachsende Zellen, weil es die Zellwandbildung hemmt (siehe DAVIS und FEINGOLD 1962). In die gleiche Gruppe von Antibiotika gehören Novobiocin (BROCK und BROCK 1959) und Streptomycin (JAWETZ et al. 1951, ANAND und DAVIS 1960).

Im Gegensatz dazu wirken oberflächenaktive Agenzien auch auf nicht wachsende, ruhende Zellen. In diese Gruppe gehören die Polymyxine (NEWTON 1956) und einige Detergenzien

wie z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) (SALTON 1951; GALE und TAYLOR 1947).

Um zu prüfen, ob PSM auch nicht wachsende Zellen von H 16 abtötet, wurden die Zellen gewaschen und über Nacht in N-freier Mineralsalznährlösung inkubiert (siehe Methoden). Nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von PSM war die Zahl der überlebenden Zellen nahezu auf die gleichen Prozentsätze gefallen wie im Falle der wachsenden Zellen. (Tab.2). PSM wirkt also auf wachsende und nicht wachsende Zellen in gleichem Maße.

Tab. 2: Herabsetzung des Koloniebildungsvermögens durch einstündige Inkubation von gewaschenen verarmten Zellen von Hydrogenomonas H 16 mit verschiedenen Konzentrationen von Pinosylvinmonomethyläther.

PSM-Konzentration (µg/mg Zell-TG)	Anfangs-Lebendzellzahl/ml	Lebendzellzahl/ml nach einstündiger Inkubation mit PSM	Zahl der überlebenden Zellen in Prozenten der PSM-freien Kontrolle
0	$2{,}21.10^9$	$2{,}10.10^9$	---
30	"	$1{,}89.10^9$	90
60	"	$1{,}20.10^9$	57
80	"	$0{,}50.10^9$	24
100	"	$2{,}90.10^7$	1,3
120	"	$5{,}30.10^4$	0,003
240	"	$1{,}60.10^3$	0,00007

2) Anreicherung und Isolierung von PSM-resistenten Zellen von Hydrogenomonas H 16:

Wie bereits aus Abb.1 hervorgeht, sind die resistenten Zellen in einer Population von Hydrogenomonas H 16 im Verhältnis von 10^{-6} enthalten. Zur Anreicherung und Isolierung der resistenten Zellen wurden 10 ml einer wachsenden Kultur (E = 0,5) mit 120 µg PSM/ml versetzt und 24 Stunden bei 28°C geschüttelt. Im Laufe von zwölfmaligen Übertragungen in PSM-haltige Nährlösung wurden die resistenten Zellen hinreichend angereichert. Durch Ausstreichen auf 120 µg PSM/ml enthaltendem Agar wurden Einzelkolonien isoliert und auf Fructose-Nährlösung angezogen. Für die weiteren Versuche wurden unter den resistenten Stämmen diejenigen ausgesucht, deren Atmung durch PSM am wenigsten gehemmt wurde. Die resistenten Stämme wurden über mindestens vier Passagen auf einer giftfreien Fructose-Nährlösung gehalten und anschließend auf die Erhaltung ihrer PSM-Resistenz geprüft.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl der Suspensionen von resistenten Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von PSM (Abb.1/B und Tab.3) ließ erkennen, daß die Zellen ihre Resistenz behalten hatten und durch 240 µg PSM/mg Zelltrockengewicht nicht abgetötet wurden. Niedere Konzentrationen hatten auch keine Wirkung. Mit diesem Befund stehen Messungen der Sauerstoffaufnahme von resistenten Zellen im Einklang (Tab.4). Während die Atmung der Zellen des Wildstammes durch 120 µg PSM/ml um 97-100% gehemmt wird, beträgt die Hemmung der auf Fructose-Nährlösung gewachsenen resistenten Zellen selbst nach siebenfacher Subkultur nicht mehr als 23-33%. Beide Versuchsergebnisse unterstützen die Annahme, daß es sich bei den resistenten Zellen wirklich um Resistenz-Mutanten und nicht um Zellen handelt, die sich an PSM adaptiert hatten.

Tab. 3: Die Zahl der Überlebenden nach einstündiger Einwirkung von verschiedenen Konzentrationen von PSM unter Wachstumsbedingungen auf die Wildstamm-Zellen und PSM-resistenten Zellen von Hydrogenomonas H 16.

PSM-Konzentration (µg/mg Zell-TG)	PSM-resistente Zellen		Wildstamm-Zellen	
	Anfang Lebendzellzahl/ml	Lebendzellzahl/ml nach einstündiger Inkubation mit PSM	Anfang Lebendzellzahl/ml	Lebendzellzahl/ml nach einstündiger Inkubation mit PSM
0	$1{,}18.10^9$	$1{,}64.10^9$	$1{,}15.10^9$	$1{,}66.10^9$
80	"	$1{,}67.10^9$	"	$0{,}60.10^9$
100	"	$1{,}37.10^9$	"	$3{,}58.10^7$
120	"	$1{,}33.10^9$	"	$6{,}90.10^4$
240	"	$1{,}43.10^9$	"	$1{,}31.10^3$

Tab. 4: Erhaltung der PSM-Resistenz über mehrere giftfreie Passagen; Hemmung der O_2-Aufnahme (Fructoseveratmung) bei wachsenden PSM-resistenten Zellen und Wildstamm-Zellen von Hydrogenomonas H 16 durch PSM.

Zahl der Übertragungen von resistenten Zellen in PSM-freiem Medium	%Hemmung der O_2-Aufnahmerate durch 240 µg PSM/mg Zell-TG	
	Wildstamm-Zellen	PSM-resistente Zellen
1	97-100	5
2	"	9
3	"	17
4	"	33
5	"	25
6	"	17
7	"	23

Es bestand nun die Frage, ob die Resistenz auf der Fähigkeit beruht, das Kernholztoxin rasch abzubauen. Diese Vermutung wurde besonders durch die Angaben von LYR (1962) herausgefordert, nach denen Enzympräparate von Laccase, Peroxydase oder Tyrosinase die Wirkung von PSM, ß- und γ - Thujaplicin und Nootkatin nach 24 bis 72stündiger Einwirkungszeit aufheben können. Die in Tab.5 zusammengestellten Versuche bestätigen diese Vermutung nicht, sondern lassen erkennen, daß PSM im Laufe von 24 Stunden weder durch den Wildstamm noch durch die resistenten Zellen abgebaut wird. Die Resistenz beruht also nicht auf der vermehrten Bildung eines PSM-abbauenden Enzymsystems, das bei gewissen Pilzen die Ursache der Resistenz gegenüber Kernholztoxinen sein kann.

Tab. 5: Die Stabilität von PSM gegenüber dem Abbau durch Wildstamm-Zellen und PSM-resistente Zellen von Hydrogenomonas H 16 im Laufe einer 24stündigen Inkubation mit PSM.

Probe	µg PSM/ml Zellsuspension	
	zur Zeit Null	nach 24stündiger Inkubation
Nährlösung + PSM	41,1	41,22
Wildtypzell-suspension + PSM	41,1	40,00
PSM-Resistent-zellsuspen-sion + PSM	41,7	39,50

Die bisherigen Befunde über die Resistenzbildung gegenüber PSM lassen folgende Aussagen zu:

1. Die resistenten Zellen lassen sich mikroskopisch nicht von den Wildtypzellen unterscheiden. Ihre Wachstumsraten unterscheiden sich nicht signifikant.
2. Im Laufe mehrerer Übertragungen in PSM-freie Nährlösungen tritt kein nennenswerter Verlust der PSM-Resistenz auf.
3. Die Resistenz beruht offenbar richt auf einer gesteigerten Fähigkeit zum Abbau von PSM.

B. Einfluss von PSM auf einzelne Stoffwechselleistungen

Nach der Annahme von LYR (1961) sollte PSM die oxydative Phosphorylierung von dem Elektronen-Transport entkoppeln. Auf der Suche nach weiteren Entkopplern der oxydativen Phosphorylierung und nach einem Agenz, das bei Hydrogenomonas H 16 die Rate der Wasserstoffoxydation in Abwesenheit von Kohlendioxyd auf die in Gegenwart von Kohlendioxyd beobachtete Oxydationsgeschwindigkeit erhöht, wurde die Wirkung von PSM auf die Rate der Substratoxydation durch PSM-empfindliche und -resistente Zellen, auf die Rate der H_2-Oxydation durch empfindliche Zellen, auf die Rate der H_2-Oxydation durch einen zellfreien Extrakt von Wildtyp-Zellen von Hydrogenomonas H 16 und schließlich auf die Glucosevergärung und die oxydative Phosphorylierung durch zellfreie Extrakte aus Bäckerhefe geprüft. Um den Wirkungsmechanismus von PSM auf Hydrogenomonas zu klären, wurden weiterhin Entgiftungsversuche mit Phospholipiden und anderen Reagenzien in die Untersuchung einbezogen; schließlich wurde PSM in seiner Wirkung mit verschiedenen anderen als Entkoppler beschriebenen Giften und mit antimikrobiell wirkenden, oberflächenaktiven Substanzen

verglichen.

Im Zuge der Atmung wird der von den Substraten im Intermediärstoffwechsel abgespaltene Wasserstoff über die Zwischenverbindungen der Atmungskette mit molekularem Sauerstoff oder einem anderen H-Acceptor zur Reaktion gebracht. Die bei diesem H- oder Elektronentransport freiwerdende Energie wird in Form von energiereichen Phosphatverbindungen festgelegt. Bei Mitochondrien ist der Elektronentransport mit der Phosphorylierung enggekoppelt; die Atmung wird durch den Verbrauch von energiereichen Verbindungen (ATP) kontrolliert.
Einer der wenigen Fälle, bei denen bei Bakterien eine Kontrolle der Rate des Elektronentransports durch ATP verbrauchende Reaktionen festgestellt worden ist, ist die Knallgas-Reaktion bei Hydrogenomonas H 16. Nur wenn die energieaufwendige Synthese von organischen Verbindungen aus Kohlendioxyd durch Zusatz von CO_2 ermöglicht wird, läuft die H_2-Oxydation mit maximaler Rate ab. Ein entkoppelndes Gift sollte auch in Abwesenheit von Kohlendioxyd die Rate der H_2-Oxydation in der Weise steigern wie Kohlendioxyd. Auf der Suche nach wirksamen Entkopplern wurde auch PSM geprüft.

Der Atmungsprozeß wird durch eine Vielzahl von Giften gehemmt. Man kann die Atmungsgifte nach ihrer Wirkung summarisch in zwei Gruppen unterbringen:

A. Spezifische Hemmstoffe: Monojodessigsäure, p-Chloromercuribenzoesäure oder Fluorid greifen in erster Linie Enzyme an, die an der Glykolyse beteiligt sind (JAMES 1953; BOYER u. SEGAL 1953). Monofluoressigsäure und Malonsäure hemmen den Tricarbonsäurezyklus spezifisch (VELICK 1953; KREBS 1954). Cyanid, Azid, CO und Antimycin A greifen spezifisch in die Atmungskette ein (CHANCE u. WILLIAMS 1956; JAKSON u. LIGHTBROWN 1958).

B. Unspezifische Hemmstoffe: sie hemmen die Atmung und die Gärung, indem sie die Cytoplasmamembran oder andere Zellgrenzflächen und Innenstrukturen schädigen oder zerstören.

Unter den ionischen Detergenzien hemmt beispielsweise Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) die Säurebildung bei gram-positiven und gram-negativen Bakterien (BAKER et al. 1941). Cyklische Polypeptid-Antibiotika scheinen ihre Wirkung über denselben Mechanismus zu entfalten, beispielsweise Gramicidin S, Polymyxin und Tyrocidin (GALE 1963; NEWTON 1956 u. MODEST et al. 1963).
Ähnlich wirken die Polyen-Antibiotika; Filipin, Nystatin und Candicidin (MARINI et al. 1961; HARSCH et al. 1963 u. CIRILLO et al. 1964).

Eine Reihe von Hemmstoffen soll zur Entkopplung der Phosphorylierung vom Elektronentransport in der Lage sein (SLATER 1963). Diese Gifte lassen sich nach ihrem Wirkungsmechanismus in zwei Gruppen einteilen:
A. Unspezifische Entkoppler: bei Mitochondrien führen sie primär zu morphologischen Veränderungen (Permeabilitätsveränderungen und Anschwellen), sekundär wird die Phosphorylierung beeinträchtigt. Zu dieser Gruppe gehören Thyroxin (TAPLEY 1956), Tetracyclin, Desoxycholat, Gramicidin und Valinomycin (CHAPPEL u. CROFT 1965; MOORE u. PRESSMAN 1964).
B. Spezifische Entkoppler: sie entkoppeln die oxydative Phosphorylierung, ohne die Mitochondrienstruktur zu verändern, möglicherweise durch Hydrolyse einer nicht phosphathaltigen, energiereichen Intermediärverbindung der Atmungskette. Das klassische Beispiel eines derartigen Entkopplers ist 2,4-DNP (LEHNINGER 1965).

Die Entkopplung der Phosphorylierung drückt sich in der Erniedrigung des P/O-Quotienten aus; während die Atmung wenigstens unvermindert anhält, geht die Phosphorylierung völlig oder auf kleine Werte zurück. Die Entkopplung kann

jedoch auch zur Erhöhung der Atmungsrate führen, wenn die Phosphorylierung den Elektronentransport begrenzt, also die Kapazität der Atmungskette größer ist als die des phosphorylierenden bzw. energieverbrauchenden Systems.

1961 fand LYR, daß PSM in einer Konzentration von 10^{-6} M die endogene Atmung isolierter Mitochondrien von Phellinus igniarius um etwa 10 bis 15% stimuliert, in höheren Konzentrationen jedoch eine Verminderung bzw. völlige Hemmung der Atmung bewirkt. Die Hefegärung wurde jedoch durch höhere Konzentrationen von PSM (über 10^{-4} M) gehemmt. Aus diesen und anderen Ergebnissen zog LYR den Schluß, daß PSM wie auch die anderen Kernholztoxine typische Entkopplungsgifte sind.

1) Substrat-Oxydation durch PSM-empfindliche und -resistente Zellen von Hydrogenomonas H 16.

Zur Prüfung der möglichen entkoppelnden Wirkung von PSM auf die Fructose-Veratmung durch Hydrogenomonas H 16 wurden die Atmungsraten manometrisch in Abwesenheit und Gegenwart verschiedener Konzentrationen von PSM erfaßt. Da das Ausmaß der Veränderung des Stoffwechsels durch PSM nicht nur von der Konzentration von PSM, sondern auch von dem Verhältnis von PSM zu Zellmaterial abhängig ist, wurde bei allen Untersuchungen die gleiche Bakteriendichte benutzt (0,5 mg Zelltrockengewicht/ml).

Die Atmung der Wildtypzellen wird weder in Phosphat - noch in Tris-HCl-Puffer von einer der geprüfter Konzentrationen stimuliert. Nur die PSM-resistenten Zellen beantworten den Zusatz geringer PSM-Konzentrationen mit einer geringen Atmungssteigerung. Bei den Wildtypzellen wird die Atmung bereits durch 50 µg/ml nahezu vollständig unterbunden (Tab.6 und Abb.2).

Tab. 6: Wirkung verschiedener Konzentrationen von PSM auf die Fructose-Veratmung durch ruhende, resistente Zellen und Wildstamm-Zellen von Hydrogenomonas H 16.

PSM-Konzentration µg/mg Zell-TG	% Hemmung, bzw. Förderung der Atmungsrate (Fructose) durch PSM			
	Zellsuspension in 0,067 M Phosphat-Puffer pH 7,0		Zellsuspension in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,2	
	Wildstamm-Zellen	PSM-Resistente	Wildstamm-Zellen	PSM-Resistente
240	-(99-100)	-45	-97	-34
120	-100	- 4	-96	+26
100	- 99	---	-97	---
80	- 95	+ 5	-74	+31
60	- 96	+19	-50	+30
40	- 68	+12	-35	+22
20	- 22	+ 6	-17	+10
10	---	+ 5	- 7	+ 9

- = Hemmung + = Förderung

Auf Fructose gewachsene Zellen wurden in der logarithmischen Phase geerntet, zweimal mit dem entsprechenden Puffer gewaschen und darin suspendiert. Die Bakterienmenge wurde auf E = 0,5 eingestellt. Pro Warburggefäß wurden nacheinander einpipettiert: 2 ml Zellsuspension (1 mg Zell-TG); 0,2 ml Fructose (20 µmole), 0,02 ml PSM-Lösung, bzw. Alkohol (Hauptraum) und 0,2 ml 20%ige KOH (Zentralgefäß). Gasatmosphäre: Luft; Temperatur: 30°C.

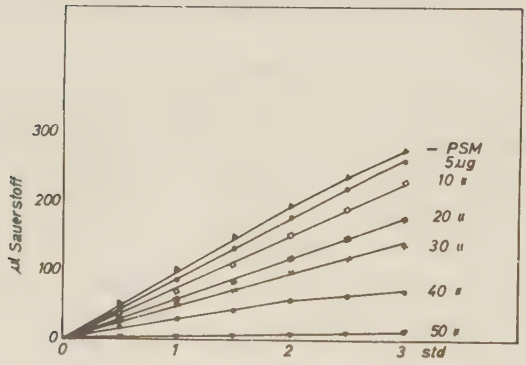


Abb.2 Die Wirkung von PSM auf die Fructoseveratmung durch Wildstamm-Zellen von Hydrogenomonas H 16 (Versuchsbedingungen wie bei Tab.6; Puffer: 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2)

Wie aus Tab.7 hervorgeht, kommt es beim Zusatz von nur einigen Giften zu einer Stimulierung der Fructoseveratmung. Lediglich 10^{-4} M 2,4-DNP und 10^{-5} M m-Cl-CCP stimulierten die Atmungsrate um 57 bzw. 88%.

Eine Stimulierung der Atmungsrate durch PSM wurde nur bei den resistenten Zellen beobachtet (Tab.6 und Abb.3). Jedoch betrug auch bei diesen die maximale Erhöhung der Atmungsrate nicht mehr als 30 bis 35%; die wirksame Konzentration war 80 bis 120 µg/mg Zelltrockengewicht. Durch 240 µg/mg Zelltrockengewicht wurde die Fructoseveratmung auch der resistenten um 30 bis 40% gehemmt. Diese Konzentration verlangsamte auch das Wachstum der PSM-resistenten Zellen, setzte aber die Lebendzellzahl nicht herab (Abb.1/B). Zur Deutung der fördernden Wirkung von PSM auf die Fruc-

toseveratmung durch resistente Zellen von H 16 mögen zwei Annahmen in Betracht zu ziehen sein:
Einerseits könnte der sonst die Atmung begrenzende Fructosetransport in die Zellen durch PSM gefördert werden; es wäre an eine zusätzliche unspezifische Substrataufnahme zu denken. Andererseits könnte eine Entkopplung, wenn sie überhaupt erfolgt, nur an einigen Stellen einsetzen. Eine Erklärung läßt sich jedoch vor einer tiefergehenden Analyse nicht geben.

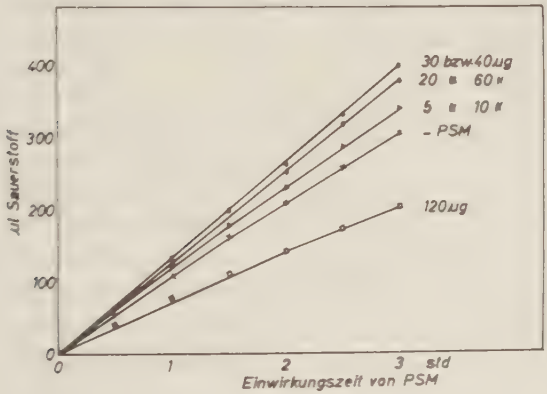


Abb.3 Die Wirkung von PSM auf die Fructoseveratmung durch resistente Zellen von Hydrogenomonas H 16 (Versuchsbedingungen wie Tab.6; Puffer: 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2.

Tab. 7: Wirkung verschiedener Antibiotika und Gifte auf die Fructoseoxydation durch gewaschene Zellen von Hydrogenomonas H 16.

Hemmstoff	Konzentration	Hemmung bzw. Förderung der Oxydationsrate
2,4-DNP	5.10^{-4}M	+ 7
	$2,5.10^{-4}$M	+ 52
	1.10^{-4}M	+ 57
m-Cl-CCP	$2,5.10^{-5}$M	- 21
	1.10^{-5}M	+ 88
	$7,5.10^{-6}$M	+ 71
	$5,0.10^{-6}$M	+ 67
	$2,5.10^{-6}$M	+ 49
PCP	5.10^{-5}M	- 52
	1.10^{-5}M	- 2
	1.10^{-6}M	0
CTAB	25 µg/ml	- 96
	12,5 µg/ml	- 88
Polymyxin B	25 µg/ml	0
	12,5 µg/ml	0
	7,5 µg/ml	0
Colistin	50 µg/ml	- 4
	25 µg/ml	- 11
	12,5 µg/ml	- 2
PSM	120 µg/ml	- (99-100)
	60 µg/ml	- 100
	50 µg/ml	- 99
	40 µg/ml	- 95
	30 µg/ml	- 96
	20 µg/ml	- 68
	10 µg/ml	- 22
Tetracyclin	10 µg/ml	+ 17
	5 µg/ml	+ 13
	2,5 µg/ml	+ 8
Gramicidin S	100 µg/ml	- 83
	50 µg/ml	- 64
	25 µg/ml	- 67
Streptomycin	100 µg/ml	- 5
	500 µg/ml	- 2
	1000 µg/ml	- 3
	5000 µg/ml	+ 7
	10000 µg/ml	+ 4
Novobiocin	100 µg/ml	- 5
	500 µg/ml	- 36
	1000 µg/ml	- 55

Versuchsbedingungen wie bei Tab.6.

Die endogene Atmung ist viel weniger empfindlich gegenüber PSM als die Fructoseveratmung. PSM-Konzentrationen, welche die Fructoseoxydation um 10 und 47% herabsetzten, erhöhten die Rate der endogenen Atmung um 70 bzw. 35% (Tab.12). Erst bei höheren Konzentrationen (60 µg PSM/mg Zell-TG) beeinträchtigte PSM auch die endogene Atmung. Zu einer angenähert gleich ausgeprägten Förderung der endogenen Atmung kam es bei H 16 durch CTAB, Tetracyclin und Streptomycin in kleinen Konzentrationen. Die endogene Atmung wird durch die Entkoppler 2,4-DNP und m-Cl-CCP ganz erheblich (auf das 3- bis 4-fache) gesteigert. Eine so ausgeprägte Steigerung der endogenen Atmung wurde durch PSM auch bei PHBS-reichen Zellen nicht erzielt.

Vergleicht man die Wirkung von PSM auf die Atmung und auf die Abtötung von Hydrogenomonas H 16 mit der Wirkung von Antibioticis und Detergenzien, so kommt die Ähnlichkeit mit CTAB und Gramicidin S deutlich zum Ausdruck. Die letzteren und PSM wirken in einer geringen Konzentration nicht nur bacterizid, sondern hemmen auch die Atmung vollständig; die bakterizide Wirkung und die Atmungshemmung erfolgen also bei nahezu derselben Konzentration. Andere Antibiotika wie beispielsweise Polymyxin B, Streptomycin oder Tetracyclin wirken in einer Konzentration bereits sehr stark bakterizid, in der sie die Atmung noch nicht nennenswert hemmen (Tab.8). In dieser Gegenüberstellung kommt der völlig verschiedene Wirkungsmechanismus beider Gruppen auf die Zelle zum Ausdruck.

Auf gärende Zellen übt PSM anscheinend fast denselben Hemmeffekt aus wie auf atmende Zellen. So wurde die Glucosevergärung durch Escherichia coli B, Leuconostoc mesenteroides und Saccharomyces cerevisiae etwa im gleichen Konzentrationsbereich in ähnlicher Weise gehemmt wie die Fructoseveratmung; die CO_2-Entwicklung wurde durch 60 µg/ml Zellsuspension völlig unterdrückt.

Tab. 8: Vergleich der durch verschiedene Gifte und Antibiotika bewirkten Atmungshemmung und Abtötung bei Hydrogenomonas H 16

Hemmstoff	Hemmung der Atmungsrate in %	% Abtötung*
PSM 50 µg/ml	- 99	98
CTAB 25 µg/ml	- 96	99,999
Polymyxin B 25 µg/ml	- 4	99,700
Streptomycin 10 mg/ml	+ 4	99,200
Tetracyclin 10 µg/ml	+ 17	99
Gramizidin S 100 µg/ml	- 83	99,400

Auf Fructose gewachsene Zellen wurden bei Extinktion 0,5 mit den entsprechenden Hemmstoffen versetzt. Hemmung der Fructoseveratmung wurde manometrisch bestimmt (Ansatz wie bei Tab.6).

*Erniedrigung der Lebendzellzahl durch 1 stdge Inkubation der Zellsuspension mit den angegebenen Hemmstoffen.

2) Wasserstoff-Oxydation durch intakte Zellen von Hydrogenomonas H 16.

Die Hemmung der Oxydation von molekularem Wasserstoff durch chemolithotroph gewachsene Zellen von Hydrogenomonas H 16 erfolgt etwa im gleichen Konzentrationsbereich mit nahezu denselben Hemmeffekten wie bei der Fructoseveratmung (Abb.4).

In noch geringeren Konzentrationen als 5 µg PSM/ml hat PSM nahezu keine Wirkung. Auch auf die Leerlaufreaktion hat PSM lediglich eine Hemmwirkung, aber nicht den erwarteten Effekt, die Rate der H_2-Oxydation auf die in Gegenwart von CO_2 beobachtete zu beschleunigen. 2,4-Dinitrophenol erhöhte die Leerlaufreaktion wenigstens um 20 bis 30% (BARTHA 1962), und m-Cl-CCP steigerte sie auf das 2,5-fache (HIPPE 1966; SCHLEGEL 1966).

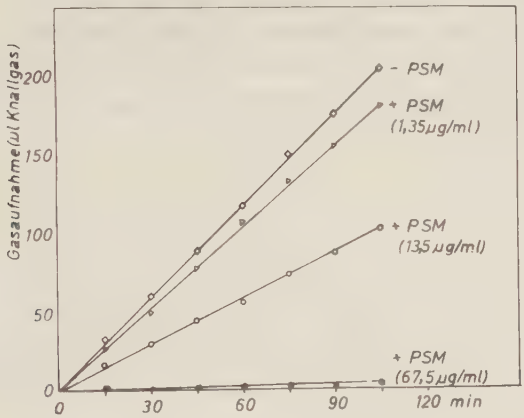


Abb.4 Einfluß von PSM auf die H_2-Oxydation mit Sauerstoff durch Hydrogenomonas H 16.

Chemolithotroph gewachsene Zellen wurden nach 24 Std in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, dreimal in 0,067 M Phosphat-Puffer, pH 7,0 gewaschen und darin aufgenommen. Pro Warburggefäß wurden nacheinander einpipettiert: 2,0 ml Zellsuspension (entsprechen 1,0 mg Zell-TG), 0,48 ml Phosphat-Puffer und 0,02 ml PSM bzw. Alkohol (Hauptraum) und 0,2 ml 20%ige KOH (Zentralgefäß). Gasatmosphäre: 80% H_2 + 10% O_2 + 10% N_2; Temperatur: 30°C.

3) Wasserstoffoxydation und Glucosevergärung durch zellfreie Extrakte

Um die Wirkung von PSM auf zellfreie Extrakte zu untersuchen, wurden zwei Systeme ausgewählt: die Wasserstoffoxydation durch zellfreie Extrakte aus Hydrogenomonas H 16 (EBERHARDT 1966) und die Glucosevergärung durch Extrakte aus Bäckerhefe.

PSM hemmt die Wasserstoffoxydation durch zellfreie Extrakte nahezu in demselben Ausmaß wie die intakten Zellen (Abb.5). Rinderserumalbumin hob die hemmende Wirkung auf zellfreie Extrakte in einem gewissen Grade auf (Abb.6). Für die antagonistische Wirkung von Serumalbumin war es gleichgültig, ob es vor oder nach PSM dem Extrakt zugesetzt wurde.

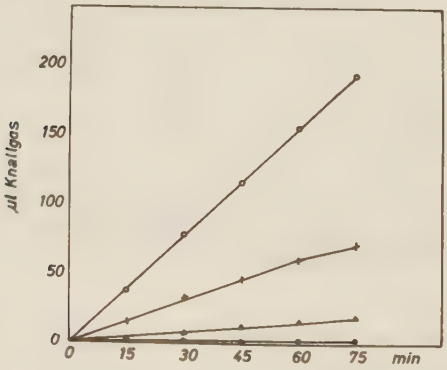


Abb.5 Einfluß von PSM auf die Wasserstoffoxydation durch den Rohextrakt (S1) aus Hydrogenomonas H 16.

Pro Warburggefäß wurden nacheinander einpipettiert: 0,1 ml Rohextrakt (2,41 mg Protein); 1,88 ml 0,067 M Phosphat-Puffer, pH 7,0; 0,02 ml PSM bzw. Alkohol (Hauptraum) und 0,2 ml 20%ige KOH (Zentralgefäß). Gasatmosphäre: 90% H_2 + 10% O_2; Temperatur: 30°C

o——o - PSM
+——+ + PSM 15 µg/ml
△——△ + PSM 30 µg/ml
●——● + PSM 60 µg/ml

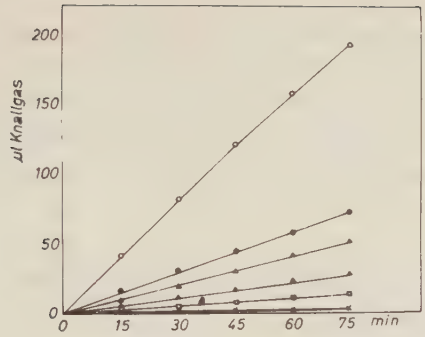


Abb.6 Antagonistische Wirkung von Serumalbumin gegenüber PSM

Pro Warburggefäß wurden nacheinander einpipettiert: 0,1 ml Rohextrakt (SI) (2,41 mg Protein); 1,68 ml 0,067 M Phosphat-Puffer, pH 7,0; 0,2 ml Serumalbumin; 0,02 ml PSM (120 µg) bzw. Alkohol (Hauptraum) und 0,2 ml 20%ige KOH (Zentralgefäß).
Gasatmosphäre: 90% H_2 + 10% O_2; Temperatur: 30°C

○——○	- PSM
●——●	+ PSM + 5 mg Serumalbumin/ml
△——△	+ " + 4 mg "
▲——▲	+ " + 2 mg "
□——□	+ " + 1 mg "
×——×	+ " + 0,5 mg "

Auch bei der Glucosevergärung (gemessen an der CO_2-Entwicklung) übt PSM eine gleich starke hemmende Wirkung auf zellfreie Extrakte (Abb.7) und intakte Zellen von Saccharomyces cerevisiae aus.

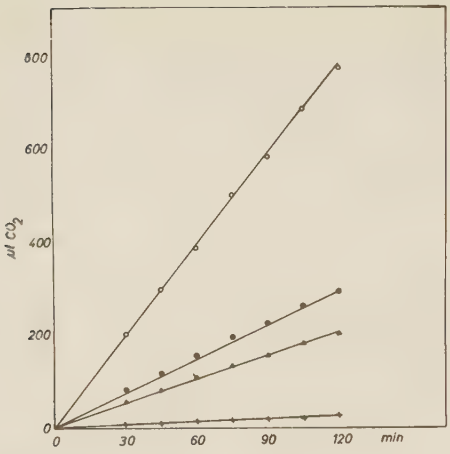


Abb.7 Einfluß von PSM auf die Fructosevergärung durch den zellfreien Rohextrakt aus Bäckerhefe.

Pro Warburggefäß wurden nacheinander einpipettiert: 0,2 ml Rohextrakt (2,36 mg Protein); $MgCl_2$ (2,4 µmole); NH_4Cl (7,5 µmol); ATP (5,0 µmole); TPP (2,5 µmole); NAD (2,5 µmole); Phosphat, pH 7,0 (59 µmole); 0,02 ml PSM bzw. Alkohol (Hauptraum); Pyruvat (10 µmole) und Glucose (120 µmole) (Zentralgefäß). Zugabe von Glucose und Pyruvat erfolgte bei Beginn der Messung. Gesamtvolumen: 2,0 ml. Gasatmosphäre: 95% N_2 + 5% CO_2; Temperatur: 30°C

- o——o — PSM
- ●——● + PSM 30 µg/ml
- △——△ + " 60 "
- ×——× + " 120 "

4) Aktivität einzelner reiner Enzyme

Im Gegensatz zu zellfreien Extrakten hatte PSM auch in höheren Konzentrationen keinen nennenswerten Einfluß auf die Aktivität einzelner reiner Enzyme, die an der Glykolyse beteiligt sind (Tab.9). Kürzlich hat LYR (1966) berichtet, daß höhere Konzentrationen von PSM SH-Gruppen-Enzyme, Hexokinase und Succinatdehydrogenase nur schwach hemmen.

Tab. 9: Einfluß von PSM auf die Aktivität einzelner Enzyme

EC Nr.	Enzyme	µg PSM/ml	Hemmung der Enzymaktivität in %
1.1.1.1	Alkohol-Dehydrogenase	60	6
		120	15
4.2.1.11	Enolase	60	11
4.1.2.b C	Fructose-1,6-diphosphat Aldolase	60	9
1.2.1.12	Glycerinaldehyd-phosphatdehydrogenase	60	14
1.1.1.28	Laktat-Dehydrogenase	60	13
2.7.1.40	Pyruvat-Kinase	60	13
		120	24

(Testansatz: siehe Methoden)

5) Antagonistische Wirkung von Phospholipiden gegenüber Pinosylvinmonomethyläther

Bei dem Versuch, die Hemmwirkung von PSM auf die Substratveratmung durch intakte Wildtypzellen von Hydrogenomonas H 16 zu unterdrücken oder aufzuheben, wurde gefunden, daß Phospholipide bereits in geringen Konzentrationen wirksam sind. Die Phospholipide Sphingomyelin und Lecithin hoben die Wirkung von PSM nahezu vollständig auf, wenn sie der Bakteriensuspension gemeinsam mit dem Gift zugefügt wurden; wurde PSM jedoch vorher zugesetzt und Lecithin erst nachfolgend zugefügt, so erfolgte keine Aufhebung der Hemmung (Abb.8).

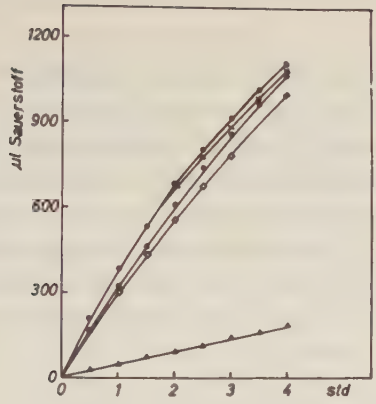


Abb.8 Antagonistische Wirkung von Phospholipiden gegenüber PSM bei Hydrogenomonas H 16

Auf Succinat gewachsene Zellen wurden in der logarithmischen Phase geerntet, zweimal mit 0,067 M Phosphat-Puffer, pH 7,0, gewaschen und darin aufgenommen. Pro Warburggefäß wurden nacheinander einpipettiert: 2,0 ml Zellsuspension (1 mg Zell-TG); 0,2 ml Succinat (40 µmole); 0,3 ml Phospholipidsuspension (2,5 mg); 0,025 ml PSM (200 µg) bzw. Alkohol (Hauptraum) und 0,2 ml 20%ige KOH (Zentralgefäß). Gasatmosphäre: Luft; Temperatur: 30°C

●——● - PSM - Phospholipide

×——× - PSM + Lecithin bzw. Sphengomyelin

○——○ + PSM + Sphingomyelin

□——□ + PSM + Lecithin

△——△ + PSM - Phosphlipide

6) Oxydative Phosphorylierung durch zellfreie Extrakte aus Bäckerhefe *

Der auf die beschriebene Weise gewonnene zellfreie Extrakt aus Bäckerhefe oxydierte Succinat unter Sauerstoff-Aufnahme, wobei anorganisches Phosphat aus dem Ansatz verschwand. Gleichzeitig war die Bildung von Glucose-6-Phosphat nachweisbar. Das Verschwinden von anorganischem Phosphat und die Bildung von Glucose-6-Phosphat wurde durch 2,4-DNP ($2{,}5 - 5 \cdot 10^{-4}$ M) vollständig gehemmt, wobei die Sauerstoff-Aufnahme kaum beeinflußt wurde. Die Oxydation des Succinats war also offenbar mit der Bildung von ATP durch oxydative Phosphorylierung verbunden.

In Tabelle 10 ist ein Versuch wiedergegeben, bei dem der Einfluß von Pinosylvinmonomethyläther auf die Sauerstoff-Aufnahme und die oxydative Phosphorylierung mit dem Einfluß des Entkopplers 2,4-DNP und des oberflächenaktiven Detergens' CTAB verglichen wurde. Bei diesem Versuch wurden dem Extrakt erst Rinderserumalbumin und danach die Gifte zugesetzt. Sauerstoff-Aufnahme und oxydative Phosphorylierung wurden durch Pinosylvinmonomethyläther nur wenig beeinflußt. 2,4-DNP hemmte die oxydative Phosphorylierung völlig und bewirkte die Freisetzung von anorganischem Phosphat. CTAB beschleunigte die Sauerstoff-Aufnahme, verringerte aber in höheren Konzentrationen signifikant die Phosphat-Veresterung.
Wird Rinderserumalbumin den Versuchsansätzen nicht zugefügt (Tabelle 11), wird auch in Abwesenheit von Giften weniger anorganisches Phosphat verestert. Pinosylvinmono-

* Für die Hilfsbereitschaft und die guten Ratschläge bei der Durchführung dieser Versuche danke ich herzlich Herrn Dr. U. Eberhardt.

methyläther beeinflußte die Sauerstoffaufnahme unter diesen Bedingungen kaum, entkoppelte aber in höheren Konzentrationen vollständig die oxydative Phosphorylierung. Werden Extrakt und Gifte zunächst 15 Min. inkubiert und dann mit Rinderserumalbumin versehen, wird die entkoppelnde Wirkung von Pinosylvinmonomethyläther, aber nicht die von 2,4-DNP, stark herabgesetzt. Rinderserumalbumin schützt also die phosphorylierenden Partikeln gegen die entkoppelnde Wirkung des Pinosylvinmonomethyläthers. In dieser Hinsicht unterscheidet sich Pinosylvinmonomethyläther von 2,4-DNP.

Tab. 10: Einfluß von Giften auf die oxydative Phosphorylierung durch einen zellfreien Extrakt aus Hefe.

Zusätze	Sauerstoff-Aufnahme (µatome)	anorg. P (µmole)	P/O
-	11,59	- 5,28	0,46
-	9,44	- 5,61	0,59
Pinosylvin (PSM)			
5 µg/ml	13,17	- 5,06	0,38
" 10 µg/ml	11,63	- 5,83	0,50
" 20 µg/ml	13,17	- 5,50	0,42
" 80 µg/ml	9,55	- 4,18	0,44
2,4-DNP $5 \cdot 10^{-4}$ M	14,03	+ 0,77	
CTAB 5 µg/ml	15,21	- 5,61	0,37
" 10 µg/ml	16,86	- 4,18	0,25
" 20 µg/ml	17,32	- 4,07	0,24
" 40 µg/ml	17,14	- 2,01	0,11
" 80 µg/ml	15,94	- 1,43	0,09

Tab. 11: Einfluß von Giften auf die oxydative Phosphorylierung durch einen zellfreien Extrakt aus Hefe.

Zusätze	Sauerstoff-Aufnahme (µatome)	anorgan.-Phosphat (µmole)	P/O-Wert
Ansätze ohne Rinderserumalbumin			
--	15,34	- 3,30	0,22
PSM 10 µg/ml	15,48	- 2,00	0,13
" 20 µg/ml	15,44	- 1,50	0,10
" 80 µg/ml	16,74	+ 1,00	-
" 120 µg/ml	10,84	+ 1,80	-
Zusatz von Rinderserumalbumin nach 15-minutiger Vorinkubation des Extraktes mit den Giften			
--	15,63	- 5,30	0,34
PSM 10 µg/ml	17,68	- 5,50	0,31
" 20 µg/ml	15,78	- 4,35	0,28
" 80 µg/ml	15, 63	- 3,85	0,25
" 120 µg/ml	16,82	- 0,90	0,05
2,4-DNP $5 \cdot 10^{-4}$ M	14,71	+ 3,35	-
CTAB 80 µg/ml	16,70	- 2,60	0,16

C: Einfluß von PSM auf die Zellpermeabilität:

Der Protoplast wird nach außen hin durch die Cytoplasmamembran abgeschlossen. Diese bestimmt die Durchlässigkeit der Zellgrenz-Schichten für bestimmte Ionen und organische Verbindungen. Die als Nahrungsstoffe dienenden organischen Substanzen werden im allgemeinen durch einen aktiven Transport in die Zelle geleitet. Dieser Transport ist energieaufwendig und im allgemeinen streng spezifisch. Die Zellen erwerben die Fähigkeit, ein bestimmtes Substrat aufzunehmen, lediglich in Gegenwart dieses Substrates und unter Bedingungen, die eine Eiweißsynthese zulassen; Chloramphenicol hemmt die Adaptation an das neue Substrat. Die Induktion eines spezifischen, aktiven Transports hat also dieselben Bedingungen zur Voraussetzung wie eine Enzymsynthese. Für den aktiven Transport macht man daher spezifische Enzyme, die sogenannten Permeasen, verantwortlich (COHEN und MONOD 1957; KEPES und COHEN 1962). Die Funktion der Permeasen ist an die Cytoplasmamembran gebunden.

Die Cytoplasmamembran und möglicherweise ihre Fortsetzung in der Zelle sind wahrscheinlich die funktionellen Einheiten des Elektronentransports und der oxydativen Phosphorylierung in den Bakterien (MITCHELL und MOYLE 1956; LASCELLES 1965) und sind wahrscheinlich auch an der Protein- und Zellwandsynthese beteiligt (BUTLER et al. 1961). Bei der Cytoplasmamembran der Bakterien handelt es sich anscheinend um komplexe Strukturen, die zu einem hohen Anteil aus Lipiden (25-30%), unter denen die Phospholipide den größten Teil ausmachen, zu 50% aus Proteinen und schließlich aus Kohlenhydraten und Glycolipiden bestehen (GILBY et al. 1958; WEIBULL und BERGSTRÖM 1958).

In Anbetracht der vielfältigen Funktionen der Cytoplasmamembran als osmotische Grenzschicht, die als Ort des aktiven Transports und als Struktur, an der sich wesentliche

Stoffwechselprozesse abspielen, erscheint es verständlich, daß jegliche Desorganisation der Cytoplasmamembran tiefgreifende Veränderungen und womöglich den Tod der Zelle zur Folge hat.

Die auf die Cytoplasmamembran wirkenden Agenzien lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: a) Zu der ersten Gruppe, deren Angehörige die Membranfunktionen direkt beeinflussen, gehören die oberflächenaktiven Agenzien, wie quarternäre Ammoniumverbindungen, cyclische Polypeptidantibiotika (Tyrocidin, Gramicidin S, Polymyxine) und die Polyenantibiotika (Filipin, Nystatin und Candicidin) (NEWTON 1964). Bei Zusatz zu einer Bakteriensuspension verbinden sich diese Agenzien direkt mit der Oberfläche der Bakterien. Die Cytoplasmamembran wird zerstört und die löslichen Zellbestandteile treten aus der Zelle aus. Diese Agenzien sind daher im allgemeinen unmittelbar bakterizid sowohl auf wachsende als auch auf nicht wachsende Zellen. Es ist dabei noch unklar, ob die Abtötung der Zelle lediglich auf einem Verlust der löslichen Zellbestandteile beruht, oder ob sie auf die Desorganisation der Membranstrukturen und damit auf ein Versagen der strukturgebundenen Reaktionen zurückzuführen ist.

b) Die zweite Gruppe umfaßt solche Verbindungen, die die Synthese der Membranen beeinträchtigen. Diese Verbindungen haben jedoch keine Wirkung auf die Permeabilität und wirken auf nicht wachsende Zellen nicht bakterizid. Zu dieser Gruppe gehören Streptomycin (ANAND und DAVIS 1960) und Novobiocin (BROCK und BROCK 1959).

Die folgenden Versuche lassen erkennen, daß PSM in geringen Konzentrationen vorwiegend auf die Zellgrenzfläche wirkt und die Permeabilitätseigenschaften verändert.

1. Verlust der Kryptizität bei Hydrogenomonas H 16 und Escherichia coli ML-35

a. Glucoseveratmung durch Hydrogenomonas H 16:

Der Wildstamm von Hydrogenomonas H 16 ist kryptisch für Glucose (GOTTSCHALK 1964), wenn die Zellen auf Fructose gewachsen sind. Diese mit Fructose als Substrat organotroph gewachsenen Zellen enthalten alle Enzyme zum Abbau und zur Verwertung auch von Glucose, können diese jedoch nicht aufnehmen. Auch durch Steigerung der Glucosekonzentration bis zu 10% war eine Glucoseveratmung nicht zu bewirken. Wurden die auf Fructose gewachsenen Zellen in Gegenwart von Glucose mit einer geringen Konzentration von PSM behandelt (5-15 ug PSM/ml Zellsuspension), so wurden die Glucoseveratmung ermöglicht. Zwar wurde auch, wie Abb.9 und Tab.12 zeigen, die endogene Atmung erhöht; mit Glucose war die Steigerung der O_2-Aufnahme-Rate jedoch erheblich größer. Die durch Glucose bewirkte Erhöhung überschreitet also die durch PSM stimulierte endogene Atmung. Es ist anzunehmen, daß diese Glucoseatmung durch eine unspezifische Erhöhung der Permeabilität gegenüber Glucose zustande kommt. Höhere PSM-Konzentrationen bewirkten jedoch eine deutliche Hemmung sowohl der endogenen als auch der Glucoseveratmung.

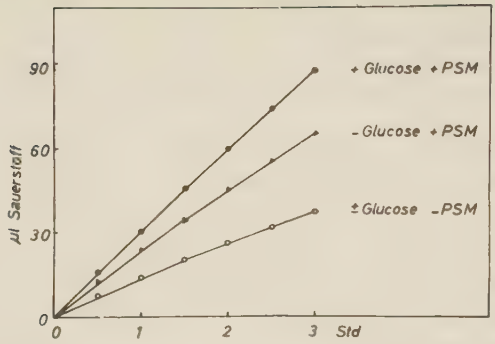


Abb. 9 Die Wirkung von PSM auf die Zellpermeabilität, gemessen an der Glucoseveratmung durch Hydrogenomonas H 16, der für Glucose kryptisch ist. (Versuchsbedingungen wie bei Tab. 10; PSM-Konzentration: 10 µg/ml Zellsuspension)

Bei diesen Versuchen mit kryptischen Zellen von Hydrogenomonas kommt die permeabilitätssteigernde Wirkung von PSM in nur geringen Effekten zur Geltung. Nicht nur die Veränderung des Transportes von Glucose, sondern auch der gemessene Stoffwechselprozeß ist an die Struktur der Cytoplasmamembran gebunden. Die Veränderung der Membran durch PSM hat also auch eine Hemmung der Atmung zur Folge; eine überragende Steigerung der Sauerstoffaufnahme konnte also nicht erwartet werden. Viel ausgeprägter sollte die permeabilitätssteigernde Wirkung von PSM in einem System zum Ausdruck kommen, in dem die zu untersuchende Stoffwechselreaktion nicht an die durch PSM beeinträchtigte Struktur gebunden ist. Daher wurden Versuche über die Spaltung eines ß-Galactosids durch kryptische Mutanten von Escherichia coli durchgeführt.

Tab. 12: Die Wirkung von PSM auf die Zellpermeabilität, gemessen an der Glucoseveratmung durch gegenüber Glucose kryptische Zellen von Hydrogenomonas H 16.

PSM-Konzentration µg/mg Zell-TG	Wirkung auf die endogene Atmung		Wirkung auf die Fructoseveratmung		Wirkung auf die Glucoseveratmung	
	µl O_2 pro mg Protein und Std	% Förderung bzw. Hemmung	µl O_2 pro mg Protein und Std	% Förderung bzw. Hemmung	µl O_2 pro mg Protein und Std	% Förderung bzw. Hemmung
0	13,91	---	64,21	---	13,91	---
10	22,63	+ 63	62,10	- 3	28,56	+ 105
20	23,69	+ 70	57,85	- 10	30,20	+ 117
30	18,56	+ 33	33,84	- 47	19,51	+ 40
60	6,48	- 53	15,20	- 76	13,97	+ 0,4

+ = Förderung - = Hemmung

Auf Fructose gewachsene Zellen wurden in der logarithmischen Phase geerntet, zweimal mit 0,067 M Phosphat-Puffer pH 7,0 gewaschen und darin suspendiert. Die Bakteriendichte wurde auf E = 0,5 eingestellt. Pro Warburggefäß wurde nacheinander einpipettiert: 2,0 ml Zellsuspension; 0,48 ml H_2O, Fructose- bzw. Glucoselösung (Endkonzentration = 2,5% und 0,02 ml Alkohol bzw. PSM (Hauptraum). 0,2 ml 20%ige KOH (Zentralgefäß). Gasatmosphäre: Luft; Temperatur: 30°C

b. Spaltung von ONPG durch eine kryptische Mutante von Escherichia coli:

Die für ß-Galactoside kryptische Mutante von Escherichia coli ML-35 (COHEN und MONOD 1957) enthält ß-Galactosidase konstitutiv, vermag jedoch weder Lactose oder ONPG noch andere ß-Galactoside aufzunehmen. Die Galactosidpermease läßt sich nicht induzieren (KEPES und COHEN 1962). Diese Mutante macht es möglich, die unspezifisch permeabilitätssteigernde Wirkung antimikrobieller Agenzien bequem an der Spaltung der chromogenen Substanz ONPG zu messen.

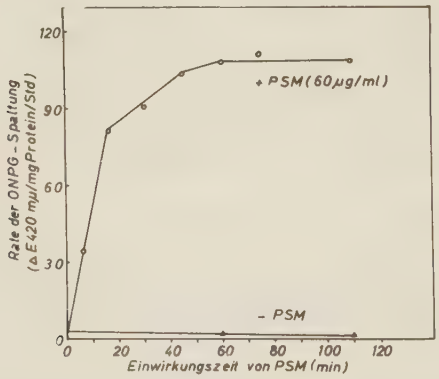


Abb.10 Zunahme der Zellpermeabilität unter der Einwirkung von PSM auf Escherichia coli ML-35, gemessen an der Rate der ONPG-Spaltung (ß-Galactosidase-Aktivität).
Zu E.coli ML-35 Glucose-Mineral-Medium (Glucose-Mineral-Medium; exponentielle Wachstumsphase; 0,156 mg Protein/ml) wurde PSM (60 µg/ml) zugesetzt und für 110 min wirken gelassen (bei 28°C geschüttelt). Die Rate der ONPG-Spaltung wurde zu den angegebenen Zeiten bestimmt (Bestimmungsansatz: siehe Methoden).

Wie aus Abb.10 deutlich hervorgeht, erhöht PSM drastisch die Permeabilität der wachsenden Zellen für ONPG. Sobald PSM der Zellsuspension zugesetzt wird, steigt die Zellpermeabilität sofort an. Nach 15 Minuten ist bereits beinahe die maximale Durchlässigkeit erreicht. Danach steigt die Permeabilität bis zum Erreichen der maximalen Permeabilität nach einer Stunde nur langsam an. Durch 60 µg PSM/ml Bakterien-Suspension wurde die ONPG-Spaltung innerhalb einer Stunde von 3 auf 108 Einheiten erhöht. Wie Tab.13 zeigt, ist die Wirkung von PSM auf die Permeabilität mit der von Penicillin (600 µg/ml), CTAB (25 µg/ml) und Polymyxin B völlig vergleichbar. Sie ist viel größer als die von Novobiocin (1000 µg/ml), Tetracyclin (20 µg/ml), Streptomycin (100 µg/ml). Chloramphenicol (50 µg/ml), die Kernholztoxine ß-Thujaplicin (120 µg/ml) und Nootkatin (120 µg/ml) hatten keine signifikante Wirkung. Wie BROCK und BROCK 1959) zeigten, hat Erythromycin (1000 µg/ml), Kaliumcyanid (10^{-3} M) und Natriumazid (10^{-3} M) auch keine ausgeprägte Wirkung auf die Permeabilität von dieser E. coli-Mutante.

Tab. 13: Änderung der Zellpermeabilität unter der Einwirkung verschiedener Hemmstoffe, gemessen an der ONPG-Spaltung (ß-Galaktosidase-Aktivität) durch den für Lactose kryptischen Stamm Escherichia coli ML-35.

Probe	Zunahme der ß-Galaktosidase-Aktivität (%)	% Hemmung des Wachstums
Kontrolle	0	
+ Penicillin 600 µg/ml	7119	100
+ Polymyxin B 200 µg/ml	1457	100
+ CTAB 25 µg/ml	4980	100
+ PSM 120 µg/ml	5545	100
+ PSM 60 µg/ml	3544	92
+ Novobiocin 1000 µg/ml	133	86
+ Tetracyclin 20 µg/ml	182	100
+ Chloramphenicol 50 µg/ml	0	100
+ Streptomycin-SO_4 100 µg/ml	141	81
+ ß-Thujaplicin 120 µg/ml	27	100
+ Nootkatin 120 µg/ml	19	100

Zu E.cole ML-35 (Glucose-Mineral-Medium; exponentielle Wachstumsphase; 0,156 mg Protein/ml) wurden die Hemmstoffe in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt und für eine Stunde einwirken gelassen (bei 28°C geschüttelt). Die Rate der ONPG-Spaltung wurde zur Zeit Null und nach einer Std (BROCK u.BROCK 1959) bestimmt. Die ß-Galaktosidase-Aktivität wurde als Zunahme der Extinktion bei 420 mµ pro Stunde und

Es ist hervorzuheben, daß die starke Erhöhung der Spaltungsrate von ONPG, die durch PSM hervorgerufen wird, nicht auf dem Austritt des Enzyms aus den Zellen beruht. Wurden die Zellen eine Stunde lang mit PSM behandelt und durch Zentrifugation vom Überstehenden getrennt, so verblieb die Enzymaktivität im Sediment, also in den Zellen. Die Erhöhung der Spaltungsrate für ONPG beruht also nicht auf dem Austritt der ß-Galactosidase aus den Zellen, sondern auf einer Erhöhung der Permeabilität der Zellgrenzflächen für ONPG. Darin unterscheidet sich die Wirkung von PSM auch von der von Penicillin; nach Behandlung der Zellen mit Penicillin blieb bei der Zentrifugation die Masse des ONPG-spaltenden Enzyms im Überstehenden. Penicillin führte also zur Lyse der Zellen und zum Austritt des Enzyms ins Suspensionsmedium.

2. Ausscheidung von Zellbestandteilen:

a) Die Ausscheidung von Kalium-Ionen:

Wie sich durch flammenphotometrische Kaliumbestimmungen in der überstehenden Lösung nach Abzentrifugieren der Zellen nachweisen ließ (Abb.11), tritt nach Zusatz von PSM zu einer Zellsuspension sofort Kalium aus den Zellen aus. Innerhalb von 5 Minuten wurden durch Zusatz von 60 µg PSM/mg Zelltrockengewicht mehr Kalium-Ionen aus den Zellen abgegeben als durch eine 20 Minuten lange Erhitzung bei 100°C freigesetzt werden konnte.

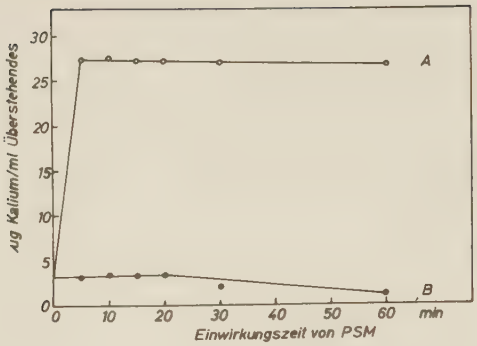


Abb.11 Ausscheidung von Kalium-Ionen aus Hydrogenomonas H 16 unter der Einwirkung von PSM.

In 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,2 aufgeschwemmte Zellen (5 mg Zell-TG/ml) wurden mit 60 µg PSM/mg Zell-TG bei 28°C aerob inkubiert (A); PSM-freie Kontrolle (B); durch Erhitzung auf 100°C (20 min) wurden 24 µg Kalium/ml Überstehendes freigesetzt; zur Kalium-Bestimmung: siehe Methoden.

b) Die Freisetzung von Pentose:

PSM-Zusatz führte auch zur Freisetzung von Pentose aus den Zellen. Nach Inkubation mit 60 µg PSM/mg Zell-TG für 6 Stunden wurden ungefähr 33% des gesamten Pentose-Gehaltes der Zellen in die Suspensionslösung abgegeben. Aus 6 Stunden mit 60 µg PSM/mg Zell-TG behandelten Zellen war ungefähr 20 mal mehr Pentose ausgetreten als aus unbehandelten Zellen (Abb.12).

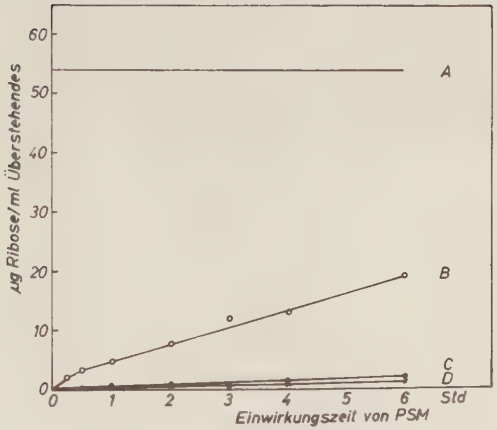


Abb.12 Ausscheidung von Ribose aus Hydrogenomonas H 16 unter der Einwirkung von PSM (60 µg/mg Zell-TG) bei 3 und 28°C.

Auf Fructose gewachsene, gewaschene Zellen wurden in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,2 aufgeschwemmt und mit 60 µg PSM/mg Zell-TG versetzt. Nach Abzentrifugieren (bei 3-5°C) der Zellen wurde im Überstehenden Ribosegehalt bestimmt.

Kurve A: Gesamtgehalt der Zellen an Ribose (µg/mg Zell-TG)

" B: + PSM (28°C)

" C: + PSM (3°C)

" D: - PSM (28°C)

c) Freisetzung bei 260 mμ absorbierenden Materials:

Durch PSM wurde auch die Freisetzung von Substanzen bewirkt, die bei 260 mμ stark absorbierten. In Abb.13 sind die Ultraviolett-Absorptionskurven des Überstehenden einer abzentrifugierten Zellsuspension wiedergegeben, die 30 Minuten lang mit PSM, Polymyxin B oder CTAB (jeweils in Konzentrationen von 60 μg/mg Zell-TG) inkubiert worden waren.

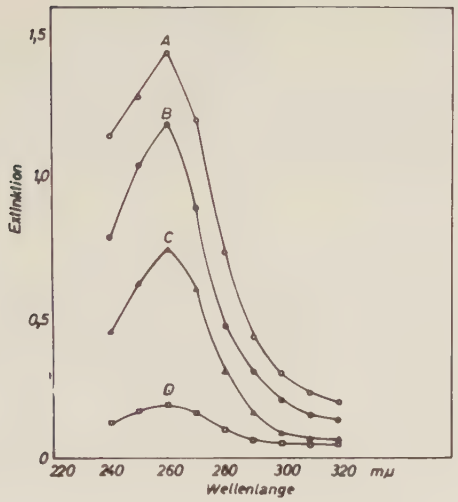


Abb.13 Ultraviolett-Absorptionskurven des Überstehenden von Suspensionen von Hydrogenomonas H 16 nach Behandlung mit verschiedenen Hemmstoffen.

Auf Fructose gewachsene Zellen wurden in 0,05 M Tris-HCl Puffer, pH 7,2 (5 mg Zell-TG/ml) suspendiert und mit den Hemmstoffen bei 28°C inkubiert. Nach 30 min wurden Proben entnommen, abzentrifugiert, das Überstehende mit Äther extrahiert (um PSM zu entfernen) und in Quarz-Küvetten vermessen.

A: + 60 µg CTAB/mg Zell-TG
B: + 60 µg PSM/mg Zell-TG
C: + 60 µg Polymyxin B/mg Zell-TG
D: Kontrolle

d) Freisetzung von anorganischem Phosphat:

Obgleich die Freisetzung von anorganischem Phosphat auch bei unbehandelten Zellen verhältnismäßig hoch war, wurde sie durch 30 Minuten lange Inkubation mit 60 ug PSM oder CTAB/mg Zell-TG etwa auf das 1,5-fache erhöht. Demgegenüber zeigte Polymyxin B (60 ug/mg Zell-TG) keine signifikante Steigerung der Freisetzung von o-Phosphat (Tab.14).

Tab. 14: Vergleich der Wirkung von PSM, Polymyxin B und CTAB (je 60 ug/mg Zell-TG) auf die Ausscheidung intrazellulärer Substanzen durch Hydrogenomonas H 16 in 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,2, (5 mg Zell-TG/ml) nach 30 min Inkubation bei 28°C.

Probe	Ausgeschiedene Substanzen im Überstehenden			
	Pentose in ug/ml	E 260 mu	K^+-Ionen in ug/ml	Anorg. P in ug/ml
Kontrolle	2,25	0,19	2,0	4,0
+ PSM	14,36	1,18	27,5	6,68
+ Polymyxin B	9,01	0,622	19,0	4,66
+ CTAB	20,98	1,28	26,5	6,19

Die Menge des im Laufe von 30 min von den Zellen ausgeschiedenen zelleigenen Materials ist von der PSM-Konzentration abhängig (Tab.15).

Tab. 15: Ausscheidung von Zellsubstanzen durch Hydrogenomonas H 16 unter der Einwirkung von PSM (30 min Inkubation)*

PSM-Konzentration µg/mg Zell-TG	Ausgeschiedene Substanzen im Überstehenden			
	Pentose in µg/ml	E 260 mµ	K^+-Ionen in µg/ml	anorg. P in µg/ml
0	2,25	0,19	2,00	4,00
60	14,36	1,18	27,50	6,68
40	12,67	1,00	20,25	6,06
20	4,22	0,56	7,50	5,24
10	3,10	0,462	3,60	4,78

*Die Zellen wurden in der logarithmischen Phase geerntet, mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,2, dreimal gewaschen und darin suspendiert (5 mg Zell-TG/ml) die Zellsuspension wurde 30 min bei 28°C geschüttelt.

e) Veränderung des Nucleotid- und Nucleinsäure-Gehalts:

Der Beobachtung, daß unter der Einwirkung von PSM Pentose und bei 260 mu absorbierendes Material aus den Zellen austritt, wurde durch Bestimmung der freien Nucleotide und der Nucleinsäure in den Zellen und im Überstehenden nachgegangen.

Die Nucleinsäure-Analyse gründete sich auf die Bestimmung der Ribose und Desoxyribose in heißen $HClO_4$-Extrakten der Zellen. Vorher wurden die Zellen mit kalter 0,5 N $HClO_4$ extrahiert, um die mit kalter $HClO_4$ extrahierbaren Materialien (freie Nucleotide) zu entfernen. Während der Einwirkung von 60 µg PSM/mg Zell-TG auf gewaschene Zellen

wurden im Verlaufe von 6 Std in verschiedenen Zeitintervallen Proben entnommen und zunächst mit kalter, dann mit heißer 0,5 N $HClO_4$ extrahiert. In den Extrakten wurden die Nucleotide und die Nucleinsäuren durch ihren Pentosegehalt erfaßt.

Wie aus Abb.14 hervorgeht, geht den Zellen während der Inkubation mit PSM bei 28°C ein Teil der Ribonucleinsäure verloren. Auch in den nicht mit PSM behandelten Kontrollzellen nahm der RNS-Gehalt ab; die Geschwindigkeit der Abnahme war jedoch gegenüber den PSM-Zellen geringer und war nicht von einem Anstieg des Pentosegehaltes im Überstehenden begleitet. Das Verhalten der Kontrolle deutet also auf einen endogenen RNS-Abbau hin. Unter der Einwirkung von PSM kam es also zu einem erheblich höheren RNS-Verlust, welcher von einem Ansteigen des Pentosegehalts und von UV-absorbierenden Material im Überstehenden begleitet ist. Der Abb.14 kann man weiterhin entnehmen, daß die mit heißer Perchlorsäure aus den Zellen extrahierbaren Substanzen bei 3°C erheblich langsamer abnehmen, sowohl in der PSM-freien Kontrolle als auch in Gegenwart von PSM.
Aus dieser ausgeprägten Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur ist zu schließen, daß die Abnahme der Zellsubstanzen auf einen enzymatischen Abbau oder einer Depolymerisierung der RNS zurückzuführen ist.

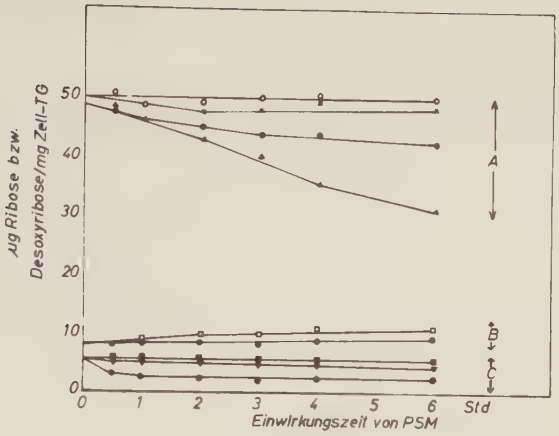


Abb.14 Abnahme des Nucleotid- und Nucleinsäure-Gehalts in Hydrogenomonas H 16 Zellen unter der Einwirkung von PSM bei 3 und 28°C.

Bedingungen wie Abb.12. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen mit kalter und heißer Perchlorsäure extrahiert; im Extrakt wurden Ribose und Desoxyribose bestimmt. PSM-Konzentration: 60 µg/mg Zell-TG.

Kurven A: Ribose im heißen Perchlorsäure-Extrakt:
- PSM (3°C)
\+ " "
\- " (28°C)
\+ " "

Kurven B: Desoxyribose im heißen Perchlorsäure-Extrakt:
- PSM (28°C)
\+ " "

Kurven C: Ribose im kalten Perchlorsäure-Extrakt:
- PSM (3 bzw. 28°C)
\+ " (3°C)
\+ " (28°C)

Der Verlust an Materialien, die sich mit kalter Perchlorsäure extrahieren lassen, hält nur während der ersten Inkubationsstunde mit PSM an.

Wie die Bestimmung der Desoxyribose in der mit heißer Perchlorsäure extrahierbaren Fraktion ergab, hat PSM auf die DNS der Zellen keinen Einfluß.

IV. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER MIT PSM BEHANDELTEN ZELLEN *

Da PSM nach den dargelegten Befunden physiologischer Untersuchungen vorwiegend als oberflächenaktives Agenz wirkte, erschien eine elektronenmikroskopische Untersuchung behandelter und nicht behandelter Zellen lohnend. In Fructose-Nährlösung wachsenden Zellen wurde PSM in einer Konzentration von 120 µg PSM/ mg Zell-TG zugesetzt; nach 30 Minuten langer Inkubation in Gegenwart von PSM wurden die Zellen mit Phosphorwolframsäure fixiert und zur elektronenmikroskopischen Aufnahme auf die Objektträger überführt.
In Abb.15 sind die Aufnahmen von unbehandelten und mit PSM behandelten Zellen einander gegenübergestellt. Die unbehandelten Zellen lassen erkennen, daß die Zelloberfläche nicht glatt, sondern stark gefaltet ist. Mit der peritrisch erscheinenden Begeißlung unterscheidet sich Stamm H 16 von den parallel untersuchten Stämmen H 1 und H 20. Durch die Oberflächenstruktur werden sonst nach dieser Methode sichtbar zu machende Innenstrukturen (Mesosomen), die möglicherweise auch in diesen Zellen vorhanden sind, verdeckt. In den unbehandelten Zellen fallen lediglich weniger kontrastreiche Areale auf, über deren Natur keine Aussagen gemacht werden können.

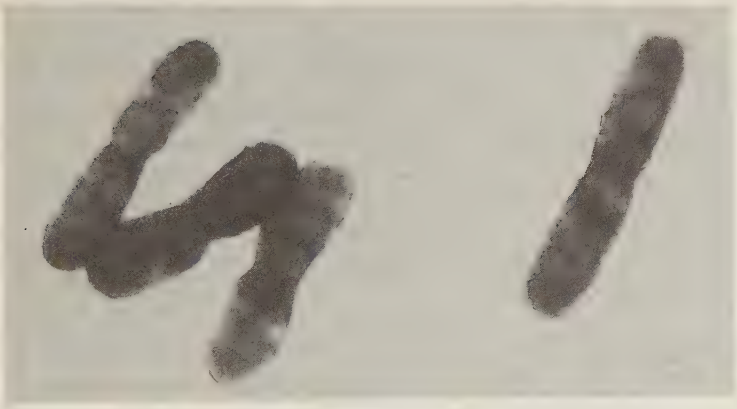
Diese kontrastarmen Areale, die man als Vakuolen ansehen könnte, sind es, welche unter der Einwirkung von PSM an Größe erheblich zugenommen zu haben scheinen. Die mit PSM behandelten Zellen unterscheiden sich von den unbehandelten Zellen signifikant. Die "Vakuolen" sind erheblich

---

* Für die Aufnahme der elektronenoptischen Bilder bin ich Herrn Prof. Dr. E. Schnepf zu Dank verpflichtet.

vergrößert, scheinen die Zelle aufgetrieben zu haben und die Faltung der Oberfläche in ihrem Bereich geglättet zu haben. Man kann nur vermuten, daß die Volumenzunahme der Vakuolen auf einer Wasseraufnahme beruht, welche durch PSM verursacht wird. Weitere Aussagen lassen sich erst nach einer tiefergehenden cytologischen Untersuchung an Ultradünnschnitten machen.

A



B

Abb.15 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hydrogenomonas H 16 (negativ-Kontrast mit Phosphorwolframsäure; Vergrößerung 18 000 x).

A : - PSM

B : + PSM (120 ug/mg Zell-TG; 30 min Inkubation)

V. DISKUSSION

Niedrige PSM-Konzentrationen (10^{-6} M) erhöhen die endogene Atmung der Mitochondrien aus dem Pilz Phellinus igniarius um etwa 15% (LYR 1961). Außerdem wurde von ruhenden Hefezellen unter der Einwirkung von PSM anorganisches Phosphat abgegeben. LYR betrachtete beide Stoffwechselveränderungen als Anzeichen für die entkoppelnde Wirkung von PSM. Er vermutete, daß PSM und andere Kernholztoxine typische entkoppelnde Agenzien wie DNP oder Pentachlorphenol sind und daß ihre mikrobizide Wirkung in erster Linie auf diesen entkoppelnden Eigenschaften beruht.

Die vorgelegten, an Hydrogenomonas Stamm H 16 gewonnenen Ergebnisse stimmen mit denen von LYR insofern überein, als PSM die endogene Atmung von intakten Bakterienzellen noch stärker stimulierte (um etwa 60 bis 70%) als die von Pilz-Mitochondrien und als PSM die Ausscheidung von anorganischem Phosphat durch Bakterienzellen erhöhte.

Diese Beobachtungen berechtigen jedoch noch nicht zu der Annahme, daß die bakterizide Wirkung des PSM auf einer Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung beruht. Dafür gibt es folgende Gründe:

a) Unmittelbar nach der Zugabe von PSM zu den Bakterienzellen werden nicht nur anorganisches Phosphat, sondern auch andere anorganische Ionen (K^+) und organische Substanzen (Pentose, Purine, Pyrimidine und Enzyme) in das Medium abgegeben. Diese Veränderungen der Zellpermeabilität und der Verlust der Kryptizität bei E.coli ML-35 traten bei Konzentrationen ein, die so niedrig waren, daß noch keine bakterizide Wirkung festzustellen war.

Die genannten Effekte lassen erkennen, daß die Ausscheidung von anorganischem Phosphat weniger durch eine Hemmung der Phosphorylierung als vielmehr durch eine unspezifische

Schädigung bestimmter Permeabilitätsschranken zustande kommt.

b) PSM stimuliert lediglich die endogene Atmung, nicht hingegen die Substratoxydation, auch wenn es in einem weiten Konzentrationsbereich angewandt wird. Demgegenüber beschleunigen 2,4-DNP und m-Cl-CCP sowohl die endogene Atmung als auch die Substratoxydation. Die Fructoseveratmung wurde durch 10^{-4} M 2,4-DNP um 57%, durch 10^{-5} M m-Cl-CCP um 88% gesteigert. Die Oxydation von ß-Hydroxybuttersäure wird durch $5 \cdot 10^{-4}$ M 2,4-DNP um 81%, durch $2 \cdot 10^{-5}$ M m-Cl-CCP um 77% beschleunigt. Die endogene Atmung wird durch PSM allerdings erheblich weniger stimuliert als durch die typischen Entkoppler 2,4-DNP und m-Cl-CCP; die Atmungssteigerung liegt in der Größenordnung der durch CTAB und andere Detergenzien bewirkten Erhöhungen.

c) Auf die Substratoxydation PSM-resistenter Zellen hat PSM eine andere Wirkung: während PSM (120 µg/mg Zell-TG) die Fructoseoxydation durch die empfindlichen Wildtypzellen um 95 bis 98% hemmt, steigert es die Fructoseoxydation der PSM-resistenten Zellen um 20 bis 30%. Eine solche Steigerung der Substratoxydation wurde bei den empfindlichen Wildtypzellen niemals beobachtet, auch nicht bei geringeren PSM-Konzentrationen.

d) Die von LYR (1961) angenommene Gleichartigkeit der Wirkung der drei Kernholztoxine PSM, ß-Thujaplicin und Nootkatin ließ sich nicht bestätigen. Unterschiede hinsichtlich der Wirkung des PSM und derjenigen der anderen Kernholztoxine betreffen insbesondere die Veränderung der Permeabilitätseigenschaften der Membranen von Bakterienzellen. Während PSM einen Verlust der Kryptizität des Stammes E.coli ML-35 für Laktose herbeiführt, hatten ß-Thujaplicin und Nootkatin keine signifikanten Effekte, obwohl sie das Wachstum ebenfalls vollständig hemmten. Es ist also durchaus wahrscheinlich, daß sich die Kernholz-

toxine in ihrem Wirkungsmechanismus voneinander weitgehend unterscheiden.

e) PSM hemmt die oxydative Phosphorylierung in zellfreien Extrakten aus Bäckerhefe mit einem Wirkungsgrad, der dem von CTAB vergleichbar ist, aber geringer ist als der von 2,4-DNP.
In Anwesenheit von Rinderserumalbumin üben PSM und CTAB im Gegensatz zu DNP kaum eine hemmende Wirkung auf die oxydative Phosphorylierung aus.

Diese Ergebnisse stehen mit denen von LYR (1966) im Einklang, nach denen auch die oxydative Phosphorylierung durch PSM sowie durch Oxytetracyclin schwächer gehemmt wird als durch DNP und PCP. Es ist bekannt, daß die Schädigung der Mitochondrienmembran eine Herabsetzung der Phosphorylierungsaktivität zur Folge hat. Viele oberflächenaktive Substanzen verursachen zunächst morphologische Veränderungen (z.B. Anschwellen) und unspezifische Permeabilitätsänderungen, wenn sie in ganz bestimmten, niedrigen Konzentrationen (die den Elektronentransport nicht hemmen) Mitochondrien zugesetzt werden. Die Beeinflussung der Phosphorylierung ist nur eine sekundäre Folgeerscheinung. Die typischen Entkoppler, z.B. DNP, unterscheiden sich von diesen Substanzen dadurch, daß sie spezifischer, ohne Zerstörung der Mitochondrienstruktur wirken. Sie lösen vielleicht energiereiche Bindungen in einigen Intermediärprodukten, die an der oxydativen Phosphorylierung beteiligt sind.

Neuere Untersuchungen von CHAPPEL und CROFT (1965) zeigten, daß die entkoppelnde Wirkung von Gramicidin auf Mitochondrien von der Gegenwart von Kalium- und Phosphat-Ionen abhängt und daß das Antibiotikum eine Diffusion von H-Ionen ins Medium verursacht. MOORE und PRESSMAN (1964) erhielten ähnliche Resultate mit dem kleineren zyklischen Peptid Valinomycin. Anscheinend verändern die beiden Polypeptide

die Permeabilität der Mitochondrienmembran für monovalente Kationen.

Kürzlich berichteten NEUMANN und JAGENDORF (1965), daß das anionische Detergenz Triton und andere Detergenzien in geringen Konzentrationen (50 bis 100 µg/ml) eine entkoppelnde Wirkung auf die Photophosphorylierung von Spinat-Chloroplasten haben. Damit ist eine Erhöhung der Grundrate der Hill-Reaktion und ein Anschwellen der Chloroplasten durch Wasseraufnahme verbunden. Es wird angenommen, daß diese durch Triton bewirkte Entkopplung auf einer Zerstörung und Permeabilitätsveränderung der Grana und der Stromalamellen beruht.

Tetracyclin, Desoxycholat sowie Thyroxin üben eine ähnliche entkoppelnde Wirkung auf Mitochondrien aus (TAPLEY 1956). Die erörterten Zusammenhänge lassen annehmen, daß die Hemmung der Phosphorylierung der Hefe-Mitochondrien durch PSM weniger durch spezifische Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung als vielmehr durch unspezifische Schädigung der Mitochondrienmembran zustande kommt.

Die an Hydrogenomonas H 16 gewonnenen Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Wirkung von PSM auf seinen oberflächenaktiven Eigenschaften beruht. Die Wirkung von PSM ist der von typischen oberflächenaktiven antimikrobiellen Verbindungen, wie den synthetischen Detergenzien (z.B. CTAB), basischen Polypeptid-Antibioticis (z.B. Tyrocidin, Gramicidin S, Subtilin und Polymyxin) oder den fungiziden Polyen-Antibioticis (Filipin und Candicidin) außerordentlich ähnlich. Die Ähnlichkeit von PSM mit oberflächenaktiven Detergenzien erstreckt sich auf folgende Eigenschaften:

a) Mit Ausnahme der Polyen-Antibiotica verursachen die genannten Verbindungen bei Bakterien einen raschen Verlust an Zellbestandteilen (HOTCHKISS 1944, GALE und TAYLOR 1947, NEWTON 1953, SALTON 1951, MOHAN et al. 1960).

Die Polyen-Antibiotika wirken zwar nicht auf Bakterien, haben aber starke fungizide Wirkung. Sie führen bei Hefe (MARINI et al. 1961) und Neurospora (KINSKY 1961) zur Ausscheidung von Zellbestandteilen. Experimente mit Protoplasten und Membranfraktionen (KINSKY 1962; LAMPEN et al. 1962) erbrachten Hinweise auf eine direkte Wirkung dieser Antibiotika auf die Zellmembran.

b) Die Wirkung von PSM auf die Permeabilität der Bakterienzellen und ihre Lebensfähigkeit setzt wie bei oberflächenaktiven Stoffen unmittelbar nach der Zugabe des PSM ein und ist nicht vom Wachstum abhängig. Darin unterscheidet es sich von der Wirkungsweise anderer Antibiotika, wie z.B. von Penicillin, welches nur auf wachsende Zellen wirkt (WOODRUFF und MILLER 1963), oder auch Novobiocin (BROCK und BROCK 1959) oder Streptomycin (DAVIS und FEINGOLD 1962), welche die Permeabilität wachsender Zellen durch Hemmung der Zellmembransynthese erhöhen und bakterizid wirken.

c) Nach seiner chemischen Struktur verfügt PSM über die charakteristischen Merkmale einer oberflächenaktiven Substanz. PSM enthält eine polare (phenolische) und eine nicht-polare Gruppe (aromatisches Gerüst). Anscheinend ist der überwiegend lipophile Charakter des PSM für seine bakterizide Wirkung von großer Bedeutung.

d) Die Phospholipide Lecithin und Sphingomyelin üben eine schützende Wirkung auf die mit PSM behandelte Zelle aus, sofern das Phospholipid vor oder gleichzeitig mit dem Gift verabfolgt wird.

Der Literatur lassen sich viele Beispiele für die schützende Wirkung von Phospholipiden gegenüber oberflächenaktiven Substanzen entnehmen. Zwischen den synthetischen ionischen Detergenzien und Lecithin, Sphingomyelin oder Kephalin bestehen antagonistische Beziehungen (BAKER et al. 1941).

Die Oberflächenaktivität des zyklischen Polypeptids Gramicidin S wird durch Kephalin herabgesetzt (DUBOS und HOTCHKISS 1941). Tyrocidine werden durch Serumlipide enthemmt (HOTCHKISS 1944). In allen Fällen mußte das Phospholipid vor oder gleichzeitig mit der antibakteriellen Verbindung zugesetzt werden. Nach FEW (1955) bilden Kephalin und andere Lipoide, die aus dem gegenüber Polymyxin E empfindlichen Pseudomonas denitrificans extrahiert worden waren, mit Polymyxin E einen Komplex. Auf Grund neuer Untersuchungen nehmen BANGHAM et al. (1965) an, daß die Wirkung biologisch aktiver Steroide auf die Membran allein durch ihre Reaktion mit den Zellwandlipiden zustande kommt, ohne daß dabei Polysaccharide, Proteine oder eine Beeinflussung des Zellstoffwechsels eine Rolle spielen. Wie BAKER et al. (1941) annehmen, schützen Phospholipide die Bakterienzelle gegen die toxische Wirkung von Detergenzien durch Veränderung der Membranstruktur, indem sie das Eindringen des Detergenz verhindern.

Im Falle des Antagonismus zwischen PSM und Phospholipiden braucht ein solcher Mechanismus nicht vorzuliegen. Die Lipide übten nur dann eine Schutzwirkung aus, wenn sie gemeinsam mit PSM zugesetzt wurden. Wurden die Zellen jedoch 30 Minuten lang mit dem Lipid inkubiert, dann abzentrifugiert und mit PSM behandelt, so war keine Schutzwirkung festzustellen. Es ist daher wahrscheinlicher, daß der Antagonismus zwischen PSM und Phospholipid auf der Bildung eines biologisch inaktiven Komplexes zwischen beiden Substanzen beruht. Einen ähnlichen Mechanismus postulierte FEW (1955) für den Antagonismus zwischen Lipoiden und Polymyxin E.

Phospholipide sind Bestandteile der stoffwechselaktiven Membranen der Mitochondrien, der Erythrozyten, des endoplasmatischen Reticulums tierischer Zellen, der Chloroplasten von grünen Pflanzen und der Protoplasten von Bakterien, Hefen und anderen Pilzen. Nach den vorliegenden Daten über die Zusammensetzung der Membranen von Micrococcus lysodeikticus, Bacillus megaterium und Staphylococcus aureus enthalten die Membranpräparationen einen hohen Anteil von Lipiden (20 bis 30% des Trockengewichtes), von dem der größte Teil aus Phospholipiden besteht. Nach der gegenwärtigen Vorstellung vom molekularen Aufbau der Zellmembran liegt eine dreischichtige Struktur vor, wobei eine Doppelschicht von orientierten Phospholipidmolekülen von zwei Proteinschichten eingeschlossen wird. Diese zuerst von DAWSON und DANIELLE (1952) begründete Vorstellung wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt (VAN ITERSON 1962; SJÖSTRAND 1963). Bei Mitochondrien machen die Phospholipide etwa 40% des Trockengewichtes aus (BALL und JOEL 1962). Die Elementarpartikeln, die in Green's Laboratorium isoliert worden sind, enthalten nur 25% des gesamten Lipidgehaltes intakter Mitochondrien. Der restliche Lipidgehalt bildet wahrscheinlich zusammen mit den Strukturproteinen die Matrix der Mitochondrien. Den Phospholipiden der Elementarpartikeln kommt anscheinend eine bedeutende Funktion beim Elektronentransport zu, da die Partikeln und ihre Untereinheiten inaktiviert werden, wenn man die Lipide extrahiert. Möglicherweise bilden sie eine Brücke zwischen den hydrophoben Proteinen (Cytochrom a, b und Eisenprotein) und der wäßrigen Phase der Mitochondrien. Der amphibatische Charakter der Phospholipide ermöglicht diese Überbrückung zwischen Proteinen mit ihren hydrophoben Gruppen und Wasser mit freien polaren anionischen Gruppen (GREEN und FLEISCHER 1963). Darüberhinaus enthalten manche prosthetische Gruppen von Elektro-

nentransport-Katalysatoren hydrophobe Seitenketten (z.B. Ubichinon), und es ist möglich, daß die Ausrichtung der Seitenketten durch eine Verbindung mit Phospholipiden erreicht wird.
Die Bedeutung der Phospholipide für die oxydative Phosphorylierung liegt wahrscheinlich in ihrer Fähigkeit, energiereiche Bindungen zu schützen, die bei der oxydativen Phosphorylierung gebildet werden und die sich in Gegenwart von Wasser instabil verhalten. Über diese Funktionen im Elektronentransport und bei der oxydativen Phosphorylierung hinaus sind den Phospholipiden mehrere dynamische Funktionen zugeschrieben worden; die interessanteste davon ist die Funktion eines Trägers im aktiven Transport von Kationen und anderen Stoffen durch die Zellmembran. Die erörterten Zusammenhänge machen deutlich, daß jede Verbindung, die die phospholipidhaltigen Strukturen schädigt, notwendigerweise starke Rückwirkungen auf den Elektronentransport, auf die oxydative Phosphorylierung und auf die Membranpermeabilität haben muß.

PSM hat in geringen Konzentrationen (10 bis 30 µg/mg Zell-TG) nur geringe bakterizide Wirkung und hemmt die Oxydation von Substraten wenig. Diese Konzentrationen beschleunigen jedoch die endogene Atmung um 60 bis 70%.
Die endogene Atmung von Hydrogenomonas H 16 wird auch durch geringe Konzentrationen von CTAB, EDTA und Tetracyclin stimuliert. NEWTON (1953) fand, daß nicht bakterizid wirkende Konzentrationen von Polymyxin die Rate der endogenen Atmung von Pseudomonas aeruginosa verdoppelten, die Oxydation von Glucose, Acetat, Oxalacetat oder Succinat aber nicht signifikant hemmten.
Die stimulierende Wirkung niedriger Konzentrationen oberflächenaktiver Substanzen ist von einer Reihe von Autoren beobachtet worden und wurde auf verschiedene Weise erklärt. Oberflächenaktive Stoffe könnten einen schon anwesenden

Hemmstoff inaktivieren, wie bei der Beschleunigung der bakteriellen Glutamat-Decarboxylase und Glutaminase durch CTAB (HUGHES 1949). Die Stimulierung könnte aber auch auf eine Veränderung der Zell-Permeabilität beruhen, wodurch die Substrate für Enzyme leichter zugänglich werden. Oder es erhöht sich durch Absterben und Lyse eines Teils des Bakterienpopulation die Konzentration von Metaboliten im Medium (NEWTON 1958).

Bei der Stimulierung der RNS-Depolymerisierung durch PSM kann es sich um einen Sekundäreffekt handeln, der vielleicht durch die Ausscheidung von Zellbestandteilen, insbesondere Mg^{++}-Ionen, bedingt wird. Werden Ribosomen beispielsweise in einem Medium mit geringer Mg-Konzentration suspendiert, so wird Ribosomen-RNS durch eine Ribonuclease abgebaut (WADE 1961; WADE u. LOVETT 1961). Auch andere Antibiotika wie Penicillin (PRESTIDGE u. PARDEE 1957), Polymyxin (NEWTON 1956), Novobiocin (BROCK u. BROCK 1959) und andere antimikrobielle Agenzien, die die Zellmembran schädigen, führen zur Freisetzung von RNS-Bestandteilen. Andererseits verfügen an Magnesium verarmte Zellen von Aerobacter aerogenes über nur wenige Ribosomen, ohne daß dadurch ihre Lebensfähigkeit herabgesetzt wird (KENNEL u. MAGASANIK 1962). Würde durch PSM nur ein Teil der Zellen geschädigt, so wäre der Schaden vermutlich nicht letal. Eine Schädigung der Membranpermeabilität dürfte jedoch weitergehende Folgen haben.

Die Glucosevergärung durch zellfreie Extrakte und intakte Zellen von Saccharomyces cerevisiae wurde durch gleiche PSM-Konzentrationen in annähernd gleichen Ausmaß gehemmt. PSM hatte dagegen keine nennenswerte Hemmwirkung auf einzelne reine Enzyme der Glykolyse. Deshalb könnte man annehmen, daß PSM mehr durch unspezifische Zerstörung membrangebundene Enzymsysteme als durch spezifische Veränderung der Zellpermeabilität für bestimmte Zellbestandteile

hemmend wirkt, wie es bei manchen Polyen-Antibiotika (Nystatin und N-Succinyl Perimycin) der Fall ist. Nystatin hemmte nur die Glucosevergärung durch intakte Zellen von Saccharomyces cerevisiae, aber nicht die Vergärung durch zellfreie Extrakte (SUTTON et al. 1960). Die fungizide Wirkung von N-Succinyl-Perimycin konnte durch Zugabe von K^+-Ionen zur flüssigen oder festen Nährböden aufgehoben werden (BOROWSKI u. CYBULSKA 1966). Eine Stütze für diese Annahme über die Wirkungsweise des PSM ist die Gleichartigkeit der Hemmwirkung auf Wasserstoffoxydation, Substratoxydation und Substratvergärung bei verschiedenen Organismen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach Untersuchungen an Hydrogenomonas H 16 hat das Kernholztoxin Pinosylvinmonomethyläther (PSM) in Konzentrationen von mehr als 20 µg/mg Zell-TG bakterizide Eigenschaften, verändert die Zellpermeabilität, hemmt die Substratveratmung und die Wasserstoffoxydation.

2. Die Wirkung von PSM war nicht von der auf das Flüssigkeitsvolumen bezogenen Konzentration (µg PSM/ml), sondern von der auf die Bakterienmasse bezogenen Konzentration (µg PSM/mg Zell-TG) abhängig.

3. PSM entfaltet seine bakterizide Wirkung sowohl auf wachsende als auch auf "ruhende" Zellen von Hydrogenomonas H 16. In niederen Konzentrationen (40 bis 100 µg/mg Zell-TG) war die prozentuale Abtötung der PSM-Konzentration annähernd proportional. Maximale Abtötung (10^{-6} Überlebende) wurde durch etwa 200 µg PSM/mg Zell-TG erreicht.

4. Die überlebenden Zellen erwiesen sich als Resistenz-Mutanten. Sie wuchsen auch in Gegenwart von 240 µg PSM/mg Zell-TG und behielten auch nach mehrfacher Subkultur in PSM-freier Nährlösung ihre Resistenz.

5. Schon unterhalb der bakteriziden Konzentration bewirkte PSM Veränderungen der Permeabilität der Zellgrenzflächen, die zur Ausscheidung von zelleigenen Verbindungen (anorganisches Phosphat, Kalium, Pentose und bei 260 mµ absorbierende Substanzen) führte; außerdem wurde Ribonucleinsäure depolymerisiert. Die zu Permeabilitätsveränderungen führende Wirkung von PSM ließ sich auch an dem für Laktose kryptischen Stamm E.coli ML-35 erkennen: die Kryptizität wurde durch PSM aufgehoben. In ähnlicher Weise wurde auch dem für Glucose kryptischen Wildstamm Hydrogenomonas H 16 die Glucoseoxydation durch PSM ermöglicht. PSM hat also auf die Permeabilität von

E.coli eine ähnliche Wirkung wie Penicillin, Cetyltrimethylammoniumbromid und andere oberflächenaktive Agenzien. Für die beiden anderen Kernholztoxine Nootkatin und Thujaplicin ließ sich eine solche permeabilitätssteigernde Wirkung an E.coli nicht nachweisen.

6. PSM hemmte die Wasserstoffoxydation und die Substratveratmung durch Hydrogenomonas H 16 in annähernd demselben Ausmaß wie die Glucosevergärung durch Escherichia coli, Leuconostoc mesenteroides und Saccharomyces cerevisiae. Den gleichen Hemmeffekt wie auf die intakten Zellen übt PSM auch auf die Wasserstoffoxydation und Glucosevergärung durch zellfreie Extrakte aus Hydrogenomonas H 16 bzw. Saccharomyces cerevisiae aus.

7. PSM hatte aber in höheren Konzentrationen keinen nennenswerten Einfluß auf die Aktivität einzelner reiner Enzyme (Alkohol-Dehydrogenase, Enolase, Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, Laktat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase).

8. Phospholipide (Lecithin und Sphingomyelin) und in geringerem Maße Serumalbumin entfalten eine Schutzwirkung gegenüber PSM.

9. PSM hemmt die oxydative Phosphorylierung in zellfreien Extrakten aus Saccharomyces cerevisiae mit einem Wirkungsgrad, der dem von Cetyltrimethylammoniumbromid vergleichbar ist, aber geringer ist als der von 2,4-Dinitrophenol.
In Anwesenheit von Rinderserumalbumin üben PSM und Cetyltrimethylammoniumbromid im Gegensatz zu 2,4-Dinitrophenol kaum eine hemmende Wirkung auf die oxydative Phosphorylierung aus.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

ANAND, N. and B.D. DAVIS	1960	Effect of streptomycin on Escherichia coli. Nature 185, 22-23
BAKER, Z., R.W. HARRISON and B.F. MILLER	1941	The bactericidal action of synthetic detergents. J.Exp.Med. 74, 611-620
BAKER, Z., R.W. HARRISON and B.F. MILLER	1941	Inhibition by phospholipids of the action of synthetic detergents on bacteria. J.Exp.Med. 74, 621-637
BALL, E.G. and C.D. JOEL	1962	The composition of the mitochondrial membrane in relation to its structure and function. Int.Rev.Cytol. 13, 99-123
BANGHAM, A.D., M.M. STANDESH and G. WEISSMANN	1965	The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. J.mol.Biol. 13, 253-259
BARTHA, R.	1962	Physiologische Untersuchungen über den chemolithotrophen Stoffwechsel neu isolierter Hydrogenomonas Stämme. Arch.Mikrobiol. 41, 313-350
BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, T. BÜCHER, R. CROK, K.H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER	1953	Diephosphofructose-Aldolase, Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang.

BLISS, E.A., C.A. CHANDLER and E.B. SCHOENBACH	1949	In vitro studies of polymyxin. Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 944-951
BOROWSKI, E. and B. CYBULSKA	1966	Studies on the mode of action of N-Succinyl Perimycin. Internationales Symposium, Reinhardsbrunn: Wirkungsmechanismen von Fungiziden und Antibiotika.
BOYER, P.D. and H.L. SEGAL	1953	Role of sulfhydryl in D-glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase catalysis. Fedarat.Proc. 12, 181
BROCK, T.D. and M.L. BROCK	1959	Effect of novobiocin on permeability of Escherichia coli. Arch.Biochem.Biophys. 85, 176-185
BÜCHER, T. und H. REDETZKI	1951	Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege. Klin.Wochenschr. 29, 615-616
BURTON, K.	1956	A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem.J. 62, 315-323

BUTLER, J.A.V., G.N. GODSON and G.D. HUNTER	1961	In Protein Biosynthesis. Unesco Symp. 349 (Harres, R.J.C., Ed., Academic press, New York)
CHANCE, B. and G.R. WILLIAMS	1956	The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol. 17, 65-134
CHAPPELL, J.B. and A.G. CROFTS	1965	Gramicidin and ion transport in isolated lower mitochondria. Biochem.J. 95, 393-402
CIRILLO, N.P., M. HARSCH and J.O. LAMPEN	1964	Action of the polyene antibiotics filipin, nystatin and N-acetyl-candidin on the yeast cell membrane. J.Gen.Microbiol. 35, 249-259
COHEN, G.N. and J. MONOD	1957	Bacterial permeases. J.Bacteriol.Rev. 21, 169-194
DAVIS, B.D. and D.S. FEINGOLD	1962	Antimicrobial agents: Mechanism of action and use in metabolic studies. In the Bacteria Vol. IV eds: I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier. Acad.Press N.Y., London. 343-397
DAVSON, H. and J.F. DANIELLI	1952	The permeability of natural membranes. Cambridge University Press
DE JONG, H.G.B.	1949	Reversal of charge phenomena, equivalent weight and specific properties of the ionised groups. In Colloid Science 2, 259, edited by H.R.Kuyt London. Elsevier

DUBOS, R.J. und R.D. HOTCHKISS 1941 The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli. J.Exp.Med. 73, 629-640

EBERHARDT, U. 1965 Über das Wasserstoff aktivierende System von Hydrogenomonas H 16. Diss. Göttingen

EBERHARDT, U. 1966 Über das Wasserstoff aktivierende System von Hydrogenomonas H 16. I. Verteilung der Hydrogenaseaktivität auf zwei Zellfraktionen. Arch. Mikrobiol. 53, 288-302

ERDTMAN, H. 1953 Über einige Inhaltsstoffe des Kernholzes der Coniferenordnung Pinales. Holz als Roh-und Werkst.11, 245-251

FEW, A.V. 1955 The interaction of polymyxin E with bacterial and other lipids. Biochem.et Biophys.Acta 16, 137-145

GALE, E.F. and E.S. TAYLOR 1947 The assimilation of aminoacids by bacteria. 2. The action of tyrocidin and some detergent substances in releasing aminoacids from the internal environment of Streptococcus faecalis. J.Gen.Mikrobiol. 1, 77-84

GALE, E.F. 1963 Mechanism of antibiotic action. Pharmacol.Rev. 15, 481-530

GILBY, A.R., A.V. FEW and K. McQUILLEN 1958 The chemical composition of the protoplast membrane of Micrococcus lysodeikticus. Biochem.Biophys.Acta 29, 21-29

GOTTSCHALK, G. 1964 Verwertung von Fructose durch Hydrogenomonas H 16. II. Cryptisches Verhalten gegenüber Glucose. Arch.Mikrobiol. 49, 96-102

GREEN, D.E. and S. FLEISCHER 1963 The role of lipids in mitochondrial electrontransfer and oxidative phosphorylation. Biochem.Biophys.Acta 70, 554-582

HARSCH, M. and J.O. LAMPEN 1963 Modification of K^+ transport in yeast by the polyene antifungal antibiotic N-acetylcandidin. Biochem.Pharmacol. 12, 875-883

HIPPE, H. 1966 Abbau und Wiederverwertung von Poly-ß-hydroxybuttersäure durch Hydrogenomonas H 16. Diss. Göttingen

HOTCHKISS, R.D. 1944 Gramicidin, tyrocidine and tyrothricin. Advances in Enzymol. 4, 153-199

HOTCHKISS, R.D. 1946 The nature of the bactericidal action of surface active agents. Ann.N.Y.Acad.Sci. 46, 479

HUGHES, D.E. 1949 Acceleration of bacterial glutamic decarboxylase and glutaminase by cetyltrimethylammonium bromide. Biochem.J. 45, 325-331

ITERSON, W.Van. 1962 Membranous structures in microorganisms. In recent Progress in Microbiology., P.14 Ed.N.E.Gibbons. Toronto: University of Toronto Press.

JACKSON, F.L. and J.W. LIGHTBROWN 1958 Inhibition of dehydrocozymase-oxidase activity of heart muscle preparations and of certain cell-free bacterial preparations by 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide. Biochem.J. 69, 63-67

JAMES, W.O. 1953 The use of respiratory inhibitors. Ann.Rev.Plant.Physiol. 4, 59-90

JAWETZ, E., J.B. GUNNISON and R.S. SPECK 1951 Studies on antibiotic synergism and antagonism: The interference of aureomycin, Chloramphenicol and terramycin with the action of streptomycin. Am.J.Med.Sci. 222, 404-412

KENNEL, D. and B. MAGASANIK 1962 The relation of ribosome content to the rate of enzyme synthesis in Aerobacter aerogenes. Biochem.Biophys.Acta 55, 139-151

KEPES, A. and COHEN, G.N. 1962 Permeation in: Gunsalus, I.C. and R.Y.Stanier. The Bacteria. New York:Acad-Press Bd -IV, 179-221

KINSKY, S.C. 1961 Alterations in the permeability of Neurospora crassa due to polyene antibiotics. J.Bact. 82, 889-897

KINSKY, S.C. 1962 Nystatin binding by protoplasts and a particulate fraction of Neurospora crassa and a basis for the selective toxicity of polyene antifungal antibiotics. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 48, 1049-1056

KREBS, H.A. 1954 The tricarboxylic acid cycle. In: D.M.Greenberg (edit.), chemical pathways of metabolism, vol.I, 109-172. New York: Academic Press

KUBOWITZ, F. und P. OTT 1943 Isolierung und Kristallisation eines Gärungsfermentes aus Tumoren. Biochem.Z. 314, 94-117

LAMPEN, J.O., P.M. ARNOW, Z. BOROWSKA and A.I. LASKIN 1962 Location and role of sterol at nystatin-binding sites. J.Bact. 84, 1152-1160

LA RIVIERE, J.W.M. 1958 On the microbial metabolism of the tartaric acid isomers. Diss. Delft

LASCELLES, J. 1965 Comparative aspects of structures associated with electron transport. Symp.Soc.Gen.Microbiol. 15, 32-56

LEDERBERG, J. 1950 The ß-D-galactosidase of Escherichia coli, strain K-12. J.Bact. 60, 381-392

LEHNINGER, A.L. 1965 The mitochondrion molecular bases of structure and function. W.A.Benjamin, inc. New York

LYR, H. 1961 Die Wirkungsweise toxischer Kernholz-Inhaltsstoffe (Thujaplicine und Pinosylvin) auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. Flora 150, 227-242

LYR, H. 1962 Enzymatische Detoxifikation der Kernholztoxine. Flora 152, 570-579

LYR, H.	1966	On the action of thujaplicins and pinosylvinmonomethylether. Internationales Symposium, Reinhardsbrunn: Wirkungsmechanismen von Fungiziden und Antibiotika.
McFARLANE, M.G.	1962	Characterisation of lipoamino-acids as o-amino-acid esters of phosphatidyl-glycerol. Nature 196, 136-138
MARINI, F., P.M. ARNOW and J.O. LAMPEN	1961	The effect of monovalent cations on the inhebition of yeast metabolism by nystatin. J.Gen.Microbiol. 24, 51-62
McMURRAY, W.C. and R.W. BEGG	1959	Effect of valinomycin on oxydative phosphorylation. Arch.Biochem.Biophys. 84, 546-548
MEJBAUM, W.	1939	Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. Z.Physiol.Chem. 258, 117-127
MITCHELL, P.D. and J. MOYLE	1956	Osmotic function and structure in bacteria. Symp.Soc.Gen.Microbiol. 6, 150-180
MODEST, E.J., G.E.Foley and S. FARBER	1963	Polypeptides and proteins as inhibitors. In: Metabolic inhibitors 1, 75-129 (Hochster, R.M. and J.H.Quastel Eds. Academic Press New York)

MOHAN, R.R. and R.S. PIANATTI 1960 Studies on the mode of action of colistin sulfate (colymycins) on Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027. Bact.Proc. 60, 99

MOORE, C. and B.C. PRESSMAN 1964 Mechanism of action of valinomycin on mitochondria. Biochem.Biophys.Res.Commun. 15, 562-567

NEWTON, B.A. 1953 The action of polymyxin on Pseudomonas pyocyanea. J.Gen.Microbiol. 8, III-IV

NEWTON, B.A. 1956 The properties and mode of action of the polymyxins. Bact.Rev. 20, 14-27

NEWTON, B.A. 1958 Surface-active bactericides. Symp.Soc.Gen.Mikrobiol. 8, 62-93

NEWTON, B.A. 1965 Mechanisms of antibiotic action. Ann.Rev.Microbiol. 19, 209-240

NEUMANN, J. and A. JAGENDORF 1965 Uncoupling photophosphorylation by detergents. Biochem.Biophys.Acta 109, 382-389

PIRSON, A. und A. KUHL 1958 Über den Phosphathaushalt von Hydrodictyon I. Arch.Mikrobiol. 30, 211-225

PRESTIDGE, L.S. and A.B. PARDEE 1957 Induction of bacteriallysis by penicillin. J.Bact. 74, 48-59

RENNERFELDT, E. 1943 Die Toxicität der phenolischen Inhaltsstoffe des Kiefernkernholzes gegenüber einigen Fäulnispilzen. Sv.Bot.Tidskr. 37, 83-93

RENNERFELT, E. 1945 The influence of the phenolic compounds in the heartwood of scots pine (Pinus silvestris L.) on the growth of some decay fungi in nutrient solution. Sv.Bot.Tidskr. 39, 311-318

RENNERFELT, E. and G. NACHT 1955 The fungicidal activity of some constituents from heartwood of conifers. Sv.Bot.Tidskr. 49, 419-432

ROTMAN, B. 1958 Regulation of enzymatic activity in the intact cell. The ß-D-Galactosidase of Escherichia coli. J.Bact. 76, 1-14 (1958)

SALTON, M.R.J. 1951 The absorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. J.Gen.Microbiol. 5, 391-403

SCHLEGEL, H.G., H. KÄLTWASSER und G. GOTTSCHALK 1961 Ein submersverfahren zur Kultur Wasserstoff-oxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch.Microbiol. 38, 209-222

SCHLEGEL, H.G. 1966 Physiology and biochemistry of Knallgasbakteria. Adv.Phys.Biochem. 2, 185-236

SCHMIDT, K., S.L JENSEN und H.G. SCHLEGEL 1963 Die Carotinoide der Thiorhodaceae. I. Okenon als Hauptcarotinoid von Chromatium okenii Perty. Arch.Mikrobiol. 46, 117-126

SJÖSTRAND, F.S. 1963 The molecular architecture of cell membrane and cytoplasmic membranes. In: Drugs and membranes, P.1. Ed.by C.A.M. Hogben. Oxford: Pergamon Press

SLATER, C.E. 1963 Uncouplers and inhibitors of oxidative phosphorylation. In: Metabolic inhibitors II, 503-538.(Hochster, R.M. and J.H.Quastel editors. Acad. Press. New York and London)

SUTTON, D., F. MARINI and J.O. LAMPEN 1960 Yeast glycolysis: Enzyme localization and the site of nystatin action. Bact.Proc. 1960, 160

TAPLEY, D.F.	1956	The effect of thyroxine and other substances in the swelling of isolated rat liver mitochondria. J.Biol.Chem. 222, 325-339
VELICK, S.F.	1953	Coenzyme binding and the thiol groups of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem. 203, 563-573
WADE, H.E.	1961	The autodegradation of ribonucleoprotein in Escherichia coli. Biochem.J. 78, 457-472
WADE, H.E. and S. LOVETT	1961	Polynucleotide phosphorylase in ribosomes from Escherichia coli. Biochem.J. 81, 319-328
WEIBULL, C. and L. BERGSTRÖM	1958	The chemical nature of the cytoplasmic membrane and cell wall of Bacillus megaterium, strain M. Biochem.Biophys,Acta 30, 340-351
WILDE, E.	1961	Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydrogenomonas. Diss. Göttingen

WILDE, E. 1962 Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydrogenomonas. Arch.Mikrobiol. 43, 109-137

WOODRUFF, H.B. and I.M. MILLER 1963 Antibiotics. In: Metabolic inhibitors, II, 23-51 (Hochster, R.M. and J.H.Quastel, Eds.,Academic Press, New York)

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H.G. Schlegel danke ich für die Überlassung des Themas, für sein reges Interesse und die stete Förderung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Außerdem bin ich Herrn Prof. Dr. H. Erdtman, Stockholm, für die Bereitung und Überlassung mehrerer Proben von Pinosylvinmonomethyläther zu Dank verpflichtet.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, der Universität Alexandria und der General-Studienmission in Kairo danke ich für die finanzielle Hilfe, die diese Arbeit ermöglichte.

Lebenslauf

Am 27.9.1937 wurde ich in Biala/Ägypten (V.A.R.) als Sohn des Kaufmanns El-Morsi Mansour Aggag und seiner Ehefrau Nasla El-Sawi Aggag geboren. Im Herbst 1944 wurde ich in Biala eingeschult. Das Abitur habe ich im Juni 1953 an der "El-Malek El-Kamel School" in Mansourah bestanden.
Im Herbst 1953 immatrikulierte ich mich an der "Faculty of Science" der Universität Alexandria, nach zwei Jahren wechselte ich das Studium und schrieb mich 1955 in der "Faculty of Pharmacy" der gleichen Universität ein.
Mein Studium schloß ich im Juni 1959 mit dem Grad eines "Bachelor of Pharmacy and pharmaceutical Chemistry" ab.
Von 1959 bis Dezember 1961 war ich als wissenschaftlicher Assistent an der "Faculty of Pharmacy" der Universität Alexandria angestellt.
Im Sommersemester 1962 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität zu Göttingen und begann im folgenden Jahr im Institut für Mikrobiologie mit der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation.

Meinen akademischen Lehrern bin ich zu großem Dank verpflichtet. Es sind dies die Herren Professoren und Dozenten: Brandis, Brockmann, Deutike, Domagk, Hollmann, Jannasch, Meyer, Pfennig, Pirson, Prell, Schlegel, Schöllkopf, Thiele und Trebst.